

# **Rapport Wetenschappelijke Trendanalyse Dierproeven**

**Coenraad Hendriksen en Rixt Komduur**

**Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA)**



**Universiteit Utrecht**

**December 2009**



<b>1 Inleiding tot het project.....</b>	<b>6</b>
1.1 Inleiding .....	6
1.2 Verantwoording van de wetenschappelijke trendanalyse .....	6
1.3 Opzet van de wetenschappelijke trendanalyse .....	8
1.4 Aanpak .....	8
1.5 Relatie met andere trendanalyses .....	9
<b>2 Leeswijzer .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Proefdieren: ontwikkelingen en trends.....</b>	<b>12</b>
3.1 Inleiding .....	12
3.2 Proefdiergebruik: feiten en cijfers.....	12
3.3 Ontwikkelingen en trends in het gebruik van proefdieren .....	18
3.3.1 Verhogen van de relevantie van het diemodel.....	18
3.3.2 Maximalisatie van informatie per dier.....	22
3.3.3 Ontwikkelingen en trends gericht op Verfijning in het gebruik van proefdieren .....	24
3.3.4 Educatie en training.....	25
3.3.5 Wetgeving met betrekking tot het gebruik van proefdieren.....	26
3.3.6 Overtolligheid en ongeschiktheid proefdier .....	27
3.4 Samenvatting .....	27
<b>4 Dierproeven: ontwikkelingen en trends.....</b>	<b>30</b>
4.1 Inleiding .....	30
4.2 Trends die een toename in het aantal dierproeven (kunnen) bewerkstelligen .....	30
4.2.1 REACH.....	31
4.2.2 Nanomaterialen.....	32
4.2.3 Ziekten bij de mens en dier en life-style ziekten .....	34
4.2.4 Risico acceptatie .....	36
4.2.5 Translationeel onderzoek.....	38
4.3 Trends die een afname in het aantal dierproeven (kunnen) bewerkstelligen .....	38
4.3.1 Experimentele opzet en statistische analyse.....	38
4.3.2 Een kritische evaluatie van bestaande diersmodellen .....	39
4.3.3 Wijzigingen in de onderzoeksstrategie en test paradigma. ....	40
4.3.4 De dierproef als confirmatie model .....	44
4.4 Samenvatting .....	46
<b>5 Alternatieven voor dierproeven: Ontwikkelingen en trends .....</b>	<b>48</b>
5.1 Inleiding .....	48
5.2 Verfijning.....	49
5.3 Vermindering .....	50
5.4 Vervangingsalternatieven.....	51
5.4.1 Ongewervelde organismen.....	51
5.4.2 Immuno-chemische en fysisch-chemische technieken .....	53
5.4.3 In silico modellen.....	55
5.4.4 Slachthuis materiaal .....	57
5.4.5 Menselijke vrijwilligers.....	58
5.4.6 Genomics technologieën .....	59

5.4.7 Systeembioïogie (Systems biology).....	63
5.4.8 Weefselkweek .....	63
5.4.9 Samenvatting.....	68
<b>6 Resultaten vragenlijst.....</b>	<b>70</b>
6.1 Respondenten .....	70
6.2 Resultaten gesloten vragen .....	70
6.3 Resultaten open vragen.....	72
<b>7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik .....</b>	<b>76</b>
<b>7.1 Biologische producten.....</b>	<b>76</b>
7.1.1 Vaccins.....	78
7.1.2 Hormoonpreparaten.....	81
7.1.3 Monoclonale antistoffen.....	82
<b>7.2 Geneesmiddelen.....</b>	<b>84</b>
7.2.1 Introductie.....	84
7.2.2 Ontwikkelingstraject geneesmiddelen .....	87
7.2.3 Trends proefdiergebruik .....	89
<b>7.3 Toxicologisch onderzoek.....</b>	<b>92</b>
7.3.1 Introductie.....	92
7.3.2 Gevalideerde 3V tests.....	95
7.3.3 Trends proefdiergebruik .....	96
<b>7.4 Diagnostiek .....</b>	<b>100</b>
7.4.1 Introductie.....	100
7.4.2 Diagnostiek van ziekten .....	102
<b>7.5 Onderwijs en training.....</b>	<b>104</b>
7.5.1 Karakteristieken proefdiergebruik.....	104
7.5.2 Alternatieven.....	106
7.5.3 Trends met betrekking tot aantallen.....	106
<b>7.6 Onderzoek naar kanker.....</b>	<b>108</b>
7.6.1 Introductie.....	108
7.6.2 Kankeronderzoek en proefdiergebruik.....	108
7.6.3 Dierexperimenteel onderzoek: bestaande modellen.....	111
7.6.4 Trends in het kankeronderzoek .....	111
<b>7.7 Trendanalyse hart- en vaatziekten .....</b>	<b>114</b>
7.7.1 Introductie.....	114
7.7.2 Onderzoek naar hart- en vaatziekten en proefdiergebruik.....	114
7.7.3 Dierexperimenteel onderzoek.....	116
7.7.4 Trends .....	117
<b>7.8 Trendanalyse Geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel.....</b>	<b>119</b>
7.8.1 Introductie.....	119
7.8.2 Proefdiergebruik.....	120
7.8.3. Trends in de categorie Geestesziekten en ziekten zenuwstelsel.....	124
<b>7.9 Andere ziekten bij de mens .....</b>	<b>125</b>
7.9.1 Introductie.....	125
7.9.3 Suikerziekte .....	127
7.9.3 Longziekten (COPD en Astma).....	129
7.9.4 Infectieziektenonderzoek.....	131
<b>7.10 Onderzoek naar het gedrag van dieren.....</b>	<b>134</b>
7.10.1 Introductie.....	134
7.10.2 Proefdiergebruik.....	135
7.10.3 Trends .....	136

<b>7.11 Wetenschappelijke vraag naar ziekten bij het dier.....</b>	<b>138</b>
7.11.1 <i>Introductie.....</i>	138
7.11.2 <i>Genoemde trends.....</i>	141
<b>7.12 Onderzoek voor een andere wetenschappelijke vraag.....</b>	<b>142</b>
7.12.1 <i>Introductie.....</i>	142
7.12.2 <i>Proefdiergebruik onderzoek voor een andere wetenschappelijke vraag.....</i>	142
7.12.3 <i>Voorbeeld andere wetenschappelijke vraag: veldbiologisch onderzoek.....</i>	144
<b>7.13 Overzicht gebruik vervangingsalternatieven in de categorieën van onderzoek.</b>	<b>149</b>
<b>8 <i>Trends in rapport</i> .....</b>	<b>150</b>
<b>8.1 Domeingebied Proefdieren .....</b>	<b>152</b>
<b>8.2.1 Domeingebied Dierproeven .....</b>	<b>154</b>
<b>8.2.2 Domeingebied Dierproeven .....</b>	<b>155</b>
<b>8.3 Domeingebied Vervangingsalternatieven voor dierproeven .....</b>	<b>156</b>
<b>9 <i>Samenvatting en conclusies</i>.....</b>	<b>158</b>
9.1 <i>Ontwikkelingen en trends.....</i>	159
9.2 <i>Ontwikkelingen en trends: beïnvloedende factoren.....</i>	161
Conclusie .....	162
<b><i>Bijlagen</i>.....</b>	<b>164</b>
<b>Bijlage 1:Lijst geïnterviewden en deelnemers workshop .....</b>	<b>164</b>
<b>Bijlage 2: Monitoringscriteria.....</b>	<b>166</b>
<b>Bijlage 3: Primaten .....</b>	<b>168</b>
<b>Bijlage 4: Genomics onderzoek feiten en cijfers.....</b>	<b>173</b>
<b>Bijlage 5: Wet en regelgeving en Relevante organisaties.....</b>	<b>175</b>
<i>Inleiding.....</i>	175
<i>Globale horizontale wetgeving .....</i>	175
<i>Horizontale wetgeving met betrekking tot dierproeven binnen de EU.....</i>	175
<i>Horizontale wetgeving in Nederland: Wet op de Dierproeven .....</i>	177
<i>Verticale wetgeving.....</i>	177
<b>Bijlage 6: Samenstelling begeleidingscommissie en andere betrokkenen .....</b>	<b>187</b>
<b>Bijlage 7: Onderzoeksvragen .....</b>	<b>188</b>
<b>Bijlage 8: Ontwikkeling 3V alternatieven.....</b>	<b>189</b>
<b>Bijlage 9: Lijst met afkortingen .....</b>	<b>198</b>

# 1 Inleiding tot het project

## 1.1 Inleiding

In juni 2008 is door het Kabinet de visie 'Alternatieven voor dierproeven<sup>1</sup>' uitgebracht. Hierin wordt beschreven hoe het overheidsbeleid ten aanzien van Vervanging, Vermindering en Verfijning van het gebruik van proefdieren (de 3Vs) in Nederland zal worden versterkt en geconcretiseerd. De visie is geplaatst in de context van de complexe omgeving waarin dierexperimenteel onderzoek plaatsvindt. Ontwikkelingen in het proefdiergebruik en in de ontwikkeling van 3V alternatieven staan onder invloed van een grote verscheidenheid aan factoren, variërend van wetenschappelijke ontwikkelingen tot maatschappelijke prioriteiten. Vaak zijn deze factoren internationaal gestuurd en niet zelden kennen ze een element van conflicterende belangen.

Het kabinet streeft naar maximale transparantie in zijn communicatie over dierproeven en 3V alternatieven. Om zicht te krijgen op de bovengenoemde complexe processen heeft de overheid aan ZonMw de opdracht gegeven een studie te laten uitvoeren naar de ontwikkelingen en trends<sup>2</sup> op het terrein van dierproeven en wetenschap die op termijn (tot 2020) invloed kunnen hebben op het beleid rondom dierproeven, proefdieren en alternatieven voor dierproeven.

Kennis van deze ontwikkelingen is om diverse redenen van belang. Het draagt bij aan de breed gedragen behoefte aan transparantie en openheid, het bevordert een objectieve informatie voorziening, het geeft inzicht in verantwoordelijkheden, het benoemt nieuwe trends of beschrijft verschuivingen in bestaande trends en, indien noodzakelijk, maakt het mogelijk alert en zelfs pro-actief op deze ontwikkelingen te reageren.

De trendanalyse is opgedeeld in twee onderscheidenlijke delen; een maatschappelijke trendanalyse en een wetenschappelijke trendanalyse. De wetenschappelijke trendanalyse is als project uitgezet bij het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA). Uitgangspunt van de studie was het benoemen, in kaart brengen en kwantificeren van de belangrijkste wetenschappelijke ontwikkelingen, nu en in de komende periode, die invloed kunnen hebben op het nationale en (Europese) internationale beleid rondom dierproeven, proefdieren en alternatieven voor dierproeven.

## 1.2 Verantwoording van de wetenschappelijke trendanalyse

In de opdrachtbrief van VWS van 25 augustus 2008 zijn de aspecten benoemd die in de trendanalyse dienden te worden meegenomen. Het betrof de volgende aandachtsgebieden:

- Type onderzoek: het bestuderen van trends met betrekking tot de doeleinden van de dierproeven, inclusief toekomstige (mogelijke) aanvullingen op deze doeleinden;

---

<sup>1</sup> Kabinetsvisie Alternatieven voor dierproeven. 4 juni 2008.

<http://www.minvws.nl/kamerstukken/vgp/2008/kabinetsvisie-alternatieven-voor-dierproeven.asp>

<sup>2</sup> In dit verslag wordt, waar mogelijk, een onderscheid gemaakt tussen het begrip 'ontwikkeling' en 'trend'. Onder 'ontwikkeling' wordt iets (bijvoorbeeld een activiteit of beleid) verstaan dat nog niet in gang is gezet maar waarvan verwacht wordt dat het in de periode tot 2020 zijn beslag zal krijgen. Onder en 'trend' wordt iets verstaan met een verleden en een waarschijnlijke continuïteit in de periode tot 2020.

- Diersoort: het bestuderen van trends met betrekking tot gebruikte diersoorten of genetische modificaties van diersoorten voor toekomstig (biomedisch) wetenschappelijk onderzoek;
- Aantal dierproeven: het bestuderen van trends met betrekking tot aantal dierproeven en de daaraan verbonden mate van ongerief. Hierbij dient te worden opgemerkt dat elke proef met een dier wordt geteld als een dierproef, ook wanneer het meerdere proeven in één proefdier betreft.
- 3V methoden (alternatieven): het bestuderen van trends met betrekking tot de ontwikkeling, validatie en implementatie van alternatieven voor dierproeven. Hierbij wordt het begrip 'alternatieven' gedefinieerd als zijnde elke methode of benadering die komt tot een Vervanging, Vermindering en/of Verfijning in het proefdiergebruik, in het navolgende aangeduid als 3V alternatieven.

Als tijdsperiode voor het in kaart brengen van de trends is een periode aangegeven tot 2020.

In het licht van de benoemde aspecten is gekozen voor een benadering waarbij ontwikkelingen in het domein van proefdieren, dierproeven en 3V alternatieven centraal staan. In het domein Proefdieren zal het proefdier centraal staan en wordt ingegaan op ontwikkelingen en trends die invloed hebben op de waarde van het diermodel voor het onderzoek en op trends die betrekking hebben op wijzigingen in het welzijn van proefdieren. Onder het domein Dierproeven zullen ontwikkelingen en trends worden besproken die gerelateerd zijn aan inzichten over onderzoeksstrategieën en achterliggende invloeden en aspecten als risicoacceptatie. Bij het domein 3V Alternatieven ten slotte zal het gaan om ontwikkelingen en trends in methoden en benaderingen die bijdragen aan een verfijning, vermindering of vervanging van het proefdiergebruik.

De wetenschappelijke trendanalyse is uitgevoerd over de gehele breedte van onderzoek<sup>3</sup> en onderwijs en niet op enkele terreinen hiervan. Deze opzet is met reden gekozen. Tot op heden is er noch nationaal, noch internationaal een systematische analyse uitgevoerd op ontwikkelingen op het gebied van proefdieren, dierproeven en alternatieven voor dierproeven. Als start van trendonderzoek leek het de opstellers dan ook opportuun de uitgangssituatie te schetsen en de gehele breedte van het onderzoek in de analyse te betrekken. Bij volgende trendstudies kan gebruik gemaakt worden van deze gegevens om een nadere analyse op een selectie van aandachtsterreinen uit te voeren. Consequentie van de brede insteek is dat in de korte projectperiode van 9 maanden, met bescheiden middelen veel informatie verzameld diende te worden. Hierdoor werden beperkingen gesteld aan de mogelijkheid om voor ieder terrein van het onderzoek diverse deskundigen te bevragen, om diepgaande literatuurstudies uit te voeren of om te detaillistisch te zijn in de beschrijving van trends. Dit laat onverlet dat deze wetenschappelijke trendanalyse een goed en compleet overzicht geeft van de wetenschappelijke ontwikkelingen die zich voordoen of zich de komende jaren zullen voordoen op de terreinen Proefdieren, Proefdieren, Dierproeven en 3V alternatieven. Een overzicht van deze ontwikkelingen wordt per toepassingsgebied binnen het onderzoek waarvoor dierproeven worden uitgevoerd gegeven in hoofdstuk 7 van dit rapport.

---

<sup>3</sup> Onder onderzoek wordt zowel het biomedisch onderzoek verstaan als ook het overig onderzoek waarvoor proefdieren worden gebruikt alsmede het testen van stoffen/geneesmiddelen/biologische producten in het kader van bestaande regelgeving

### 1.3 Opzet van de wetenschappelijke trendanalyse

Als leidraad voor de wetenschappelijke trendanalyse zijn de volgende onderzoeksvragen geformuleerd:

- Welke ontwikkelingen doen zich voor die de rol van het proefdier in het onderzoek zou kunnen doen versterken, respectievelijk zou kunnen doen afnemen;
- Welke ontwikkelingen doen zich voor die invloed hebben of kunnen doen hebben op het welzijn van de proefdieren;
- Welke ontwikkelingen doen zich voor in het onderzoek en beleid die het aantal dierproeven zal verlagen, respectievelijk verhogen;
- Welke ontwikkelingen doen zich voor in het onderzoek en beleid dat het belang van 3V alternatieven zal doen toenemen, respectievelijk afnemen;
- Wat zijn de belangrijkste kengetallen en parameters die kunnen worden gebruikt voor een periodieke monitoring van de trends op het gebied van proefdieren, dierproeven en 3V alternatieven.

Wanneer in het navolgende over 'het veld' wordt gesproken dan wordt hiermee bedoeld de respondenten van de enquête, de leden van de begeleidingscommissie, de deelnemers aan de workshop, de geïnterviewde deskundigen en informatie die uit de wetenschappelijke literatuur naar voren gekomen is.

### 1.4 Aanpak

Voor de inventarisatie van de trends en ontwikkelingen zijn een groot aantal deskundigen op het gebied van proefdieren, dierproeven en/of 3V alternatieven geïnterviewd. Bij voorkeur werden interviews gehouden met deskundigen die voor een specifiek gebied van het onderzoek over een zogenaamde 'helikopter view' beschikten of op detailgebied over een specifieke expertise. Daarnaast werden vertegenwoordigers geïnterviewd die een centrale positie innemen in relevante organisaties of commissies (zie voor een overzicht van de geconsulteerde experts bijlage 1). Door de gebruikte selectie was het mogelijk informatie te verzamelen over de gehele breedte van toepassingsgebieden voor dierexperimenteel onderzoek. Daarbij werden de categorieën van onderzoek, zoals gehanteerd in de jaarlijkse inventarisatie van het proefdiergebruik in Nederland 'Zo doende' van de VWA als uitgangspunt genomen. Dit maakte het ook mogelijk om aan de hand van de gegevens uit 'Zo doende' retrospectief informatie te verzamelen over ontwikkelingen in het proefdiergebruik.

Ontwikkelingen en trends die uit de interviews naar voren kwamen zijn, voor zover relevant en noodzakelijk, geplaatst in de context van ontwikkelingen en trends zoals beschreven in de literatuur. Voor dit doel vond parallel aan de interviews een literatuurstudie plaats.

Ten slotte is in het kader van de studie getracht een indruk te krijgen over de mening in de wetenschappelijke gemeenschap over trends op het gebied van proefdieren, dierproeven en 3V alternatieven. Hiertoe is een digitale enquête verstuurd naar 275 onderzoekers, vergunninghouders, proefdierkundigen en onderzoeksverenigingen, NGO's en biotechnici met het verzoek deze in te vullen en zo mogelijk door te sturen aan collega's en andere betrokkenen. De enquête, die werd gecombineerd met een enquête in het kader van de Programmeringsstudie Alternatieven voor dierproeven, bestond uit algemene vragen over de achtergrond van de respondenten, open vragen over huidig 3V onderzoek, en open en gesloten vragen over trends met betrekking tot het de onderwerpen van de wetenschappelijke trendanalyse. Helaas

werd door slechts 20% van de aangeschrevenen een ingevulde enquête geretourneerd. Hierbij dient te worden meegenomen dat door sommigen respondenten de mening werd vertegenwoordigd van een bepaald instituut, instelling of afdeling. Hoewel door de lage respons een beperkte waarde moet worden toegekend aan de enquête zijn de resultaten hiervan toch indicatief en is om die reden besloten de uitkomst op te nemen in het rapport. In de rapportage over de enquête zal een overzicht worden meegenomen van de verdeling van de respondenten naar achtergrond en herkomst.

Voor de wetenschappelijke trendanalyse is een Begeleidingsgroep ingesteld. Deze begeleidingsgroep was samengesteld uit vertegenwoordigers vanuit het fundamenteel en toegepast onderzoek en vanuit regelgeving en het beleid (zie voor een overzicht van de begeleidingscommissie bijlage 2). Tot de taken van de begeleidingscommissie behoorden: 1) sturing in de projectdoelstellingen en projectuitvoering, 2) bewaking van het projectproces en de projectvoortgang, 3) leveren van een bijdrage aan een effectieve netwerkstructuur, 4) kwaliteitsbewaking van verslaglegging.

### **1.5 Relatie met andere trendanalyses**

Parallel aan de wetenschappelijke trendanalyse is een maatschappelijke trendanalyse Dierproeven en 3V alternatieven uitgevoerd door de Vrij Universiteit (projectleider Prof. dr. Tjard de Cock Buning, Vrije Universiteit). Gedurende het onderzoek heeft er regelmatig uitwisseling van informatie plaatsgevonden, hetzij door aanwezigheid bij bijeenkomsten van de begeleidingsgroepen, deelname aan de workshops of op ad hoc basis. Daarnaast is kennis genomen van de trendanalyse Biotechnologie en is gesproken met leden van de redactiecommissie. Verder is er contact geweest met projectleiders van 3 ZonMw studies die momenteel lopen en die richten op een inventarisatie van 'witte vlekken' in de toepassingsgebieden toxicologisch onderzoek, vaccin onderzoek en systematische literatuurstudies. Ten slotte heeft een reguliere uitwisseling van informatie plaatsgevonden met de voorbereidingsfase van de Programmeringsstudie Alternatieven voor dierproeven die momenteel wordt uitgevoerd.

## 2 Leeswijzer

In dit rapport worden de wetenschappelijke ontwikkelingen en trends beschreven die invloed zullen hebben op de domeinen Proefdieren, Dierproeven en 3V alternatieven. Hoofdstuk 1 geeft de achtergronden, de doelstellingen en de aanpak van het project. In Hoofdstuk 3 zal worden ingegaan op het domein proefdieren en op de ontwikkelingen die de waarde van het diemodel voor het onderzoek/onderwijs de komende jaren zal doen toenemen, respectievelijk afnemen en op ontwikkelinge gericht op een verbetering van het welzijn van proefdieren. In Hoofdstuk 4 staan de dierproeven centraal. Ingegaan zal worden op ontwikkelingen en trends die zullen of kunnen leiden tot een toename in het doen van dierexperimenteel onderzoek, zoals het aspect risico acceptatie, en op trends die tot een daling van het aantal dierproeven of aantal dieren per experiment kunnen leiden. Veranderde inzichten in onderzoeksstrategieën nemen in dit onderdeel een belangrijke plaats in. In hoofdstuk 5 zullen de ontwikkelingen en trends worden benoemd op het terrein van 3V methoden. De bespreking zal gebeuren aan de hand van de categorieën 3V methoden die veelal worden onderscheiden. Het zwaartepunt in dit hoofdstuk zal liggen op vervangingsalternatieven. Voor zover mogelijk zal een indicatie worden gegeven over de tijdfasering waarin de ontwikkelingen zullen plaatsvinden. Hoofdstuk 6 beschrijft de resultaten van de uitgevoerde enquête en plaatst de resultaten hiervan in de context van de uitgevoerde interviews. In Hoofdstuk 7 zal per toepassingsgebied van het onderzoek een korte beschrijving worden gegeven van dierexperimenteel onderzoek en van de belangrijkste ontwikkelingen en trends die zich met betrekking tot de domeinen Proefdieren, Dierproeven en 3V alternatieven voordoen. Zover als mogelijk zullen de toepassingsgebieden worden gekarakteriseerd door retrospectieve gegevens over proefdiergebruik uit de rapporten Zo doende van de VWA. Hoofdstuk 8 vat de in de voorgaande hoofdstukken benoemde trends samen en geeft een prioritering naar belang en kwantificering van omvang. Hoofdstuk 9 beschrijft de conclusies van het rapport. Verder zijn een aantal bijlagen in het rapport opgenomen en bevat het rapport een overzicht van gebruikte afkortingen. Voor een overzicht wordt verwezen naar de inhoudsopgave.

De belangrijkste conclusies van het rapport worden in een aantal quotes samengevat.

- *'Less animals, more data'* : de duidelijke tendens om door de introductie van innovatieve technieken als beeldvormende apparatuur, telemetrie of genomics de hoeveelheid informatie per dier te maximaliseren. Hierdoor zal het veelal mogelijk worden het aantal dieren per experiment te verminderen en de relevantie van het onderzoek te vergroten.
- *'Happy animals make good science'* : achterliggende gedachte is dat gezondheid en welzijn van het proefdier van invloed zal zijn op de kwaliteit van het onderzoek. Aspecten die hieraan bijdragen zijn goede educatie en training en een wetgeving die de kaders aangeeft waaraan adequate verzorging en welzijn van proefdieren moet voldoen. Ook de toenemende aandacht voor toepassing van pijnbestrijding en humane eindpunten valt onder deze categorie.
- *'Be humane, but get the results'* : deze kernzin kan als de drijvende kracht achter de ontwikkeling van 3V alternatieven worden gezien. Het geeft ook het dilemma weer waarvoor de onderzoekswereld zich gesteld ziet; de maatschappelijke behoefte aan een optimale kwaliteit van leven (zowel materieel als fysiek) zonder dat daarvoor belastende dierproeven nodig zijn.

- *'Only do what we need to know and if you do, try to understand'* : ontwikkelingen en trends die vooral betrekking hebben op het eerste deel van deze kernzin zijn de aandacht voor de experimentele opzet en de kritische evaluatie van bestaande diermodellen. Dominant in de analyse zijn de ontwikkelingen en trends die gericht zijn op het verkrijgen van informatie over achterliggende mechanismen in (patho)fysiologische processen. Daarbij kan gedacht worden aan het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren maar ook aan het toenemend gebruik van vervangingalternatieven als weefselkweek (stamcellen, tissue engineering) en fysisch-chemische methoden.
- *'Don't modify, but change'* : onder deze categorie vallen de ontwikkelingen en trends die betrekking hebben op een fundamentele wijziging in onderzoeksstrategieën. Uitgangspunt is veelal dat de klassieke onderzoeksstrategie beperkingen kent en/of de vervanging van individuele testen door 3V alternatieven een lange en moeizame weg is. Een radicale verandering van teststrategie zou zowel een effectieve manier zijn om de relevantie van het onderzoek te vergroten als een aantrekkelijke route om proefdiervrije methoden te implementeren.
- *'Want more, but accept less'* : deze kernzin is gerelateerd aan de toenemende diversificatie en beschikbaarheid van stoffen, geneesmiddelen en vaccins en aan de trend als maatschappij minder geneigd te zijn negatieve effecten en bijwerkingen van deze producten te aanvaarden.
- *'Get more knowledge involved'*: een verwijzing hierbij vindt plaats naar het toenemende multi-disciplinaire karakter in het onderzoek, door het gebruik van innovatieve technologieën als genomics, system biology en dergelijke en naar de trend tot intensivering van translationeel onderzoek.

De kanttekening wordt gemaakt dat wetenschappelijke trends gestuurd worden door beïnvloedende factoren. Met namen worden genoemd de financiering van onderzoek, het aanwezig zijn van conflicterende belangen, de internationale context van het onderzoek en de effecten van regelgeving.

Gezien het grote aantal trends en de diversiteit aan effecten en beïnvloedende factoren valt moeilijk te voorspellen hoe het proefdiergebruik zich zal ontwikkelen in de periode tot 2020. Geconstateerd wordt echter dat er een impliciete tendens is binnen het onderzoek gericht op de ontwikkeling van het 'ideale' model. In Hoofdstuk 9 wordt aangegeven beschreven wat de kenmerken zijn van het 'ideale' model. Het diermodel voldoet op een aantal punten niet aan deze omschrijving, veel van de thans bestaande vervangingsmodellen overigens ook niet. Wel wordt echter verwacht dat de ontwikkelingen bij deze laatste categorie sneller zullen gaan en meer voordelen bieden dan bij de categorie van de diermodellen. Geconcludeerd wordt dat de rol van het dierexperimenteel onderzoek zich wijzigt en dat er een moment zal komen, overigens na 2020, dat het dierexperimenteel onderzoek eerder de uitzondering dan de regelmaat zal zijn in het wetenschappelijk en wettelijk verplichte onderzoek.

## 3 Proefdieren: ontwikkelingen en trends

### 3.1 Inleiding

Nederland heeft een traditie als het gaat om het gebruik van dieren voor onderzoeksdoeleinden. Landgenoten als Reinier de Graaf en Antoni van Leeuwenhoek, beide uit de 17e eeuw, hebben internationale faam verworven met hun experimenten op dieren<sup>4</sup>. Hun studies waren veelal empirisch van opzet en vonden plaats onder omstandigheden die wetenschappelijk en ethisch nu volstrekt onaanvaardbaar zouden zijn. Zo waren anesthesie en pijnbestrijding onbekend. Tekeningen van experimenten van de Graaf laten operatieve ingrepen bij honden zien die onverdoofd en volledig bij bewustzijn waren.

Onze kennis over het proefdier is de afgelopen eeuwen sterk toegenomen. Hierdoor hebben wetenschappelijke disciplines als microbiologie, farmacologie en moleculaire biologie zich kunnen ontwikkelen. Op hun beurt hebben deze ontwikkelingen de basis gelegd voor een verdere optimalisatie en diversificatie in het gebruik van proefdieren. Anesthesie en analgesie zijn state-of-the-art in het dierexperimenteel onderzoek en ook het aantal diermodellen dat tegenwoordig beschikbaar is en dat voor specifieke vraagstellingen kan worden ingezet, is aanzienlijk. In dit hoofdstuk zullen een aantal ontwikkelingen aan de orde komen die het belang van het proefdier als onderzoeksmodel kunnen doen verkleinen of vergroten.

Kennisvermeerdering heeft niet alleen bijgedragen aan de toegenomen instrumentele waarde van het diermodel. In de afgelopen decennia is veel bekend geworden over de ethologische behoeften van het proefdier en het vermogen van het dier om pijn en ongerief te ervaren. Dit heeft geleid tot een erkenning van de intrinsieke waarde van het dier<sup>5</sup>, een herbezinning op de rol van het proefdier in het onderzoek en een beleid dat gericht is op het verminderen van ongerief in experimenten of het maximaliseren van het welzijn van de dieren. Ontwikkelingen en trends op dit gebied zullen eveneens in dit hoofdstuk worden toegelicht. Allereerst echter zal in aan aantal grafieken informatie worden gegeven die het gebruik van proefdieren in het onderzoek karakteriseren. Daarna zal worden ingegaan op de ontwikkelingen en trends waarbij het proefdier centraal staat. Grofweg zijn deze onder te verdelen in twee categorieën:

- ontwikkelingen en trends die zullen bijdragen aan een grotere relevantie van het diermodel en derhalve aan een toenemend belang van het diermodel voor het onderzoek of ontwikkelingen die gericht zijn op een maximalisatie van informatie die per dier verkregen kan worden.
- ontwikkelingen en trends die gericht zijn op het verfijnen van het dierexperimenteel onderzoek, hetzij door een vermindering van het ongerief, hetzij door een maximalisatie van het welzijn van het dier.

### 3.2 Proefdiergebruik: feiten en cijfers

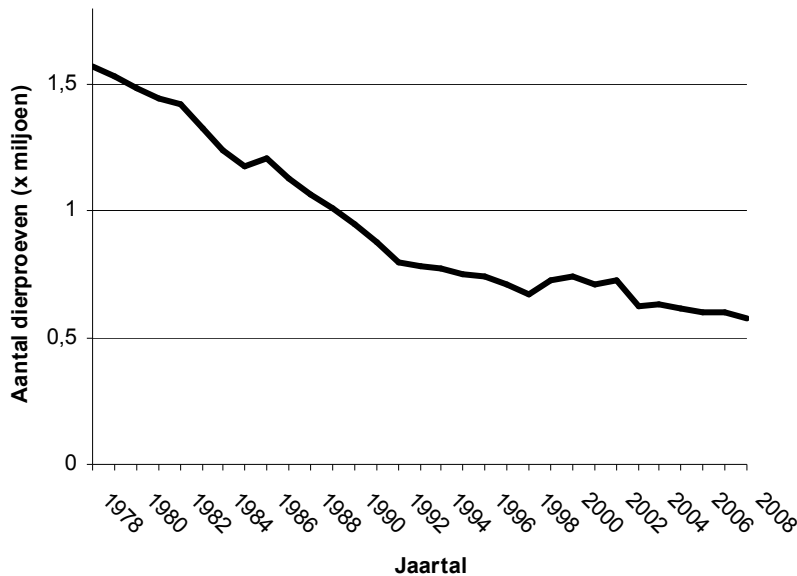
Dierproeven worden verricht voor een grote verscheidenheid aan vraagstellingen, uiteenlopend van productie van antisera en routine controle van farmaca tot fundamenteel onderzoek aan neuronale netwerken. De doeleinden waarvoor dieren mogen worden gebruikt zijn vastgelegd in art.1, lid 1 van de Wet op de dierproeven (Wod). Door de jaarlijkse

---

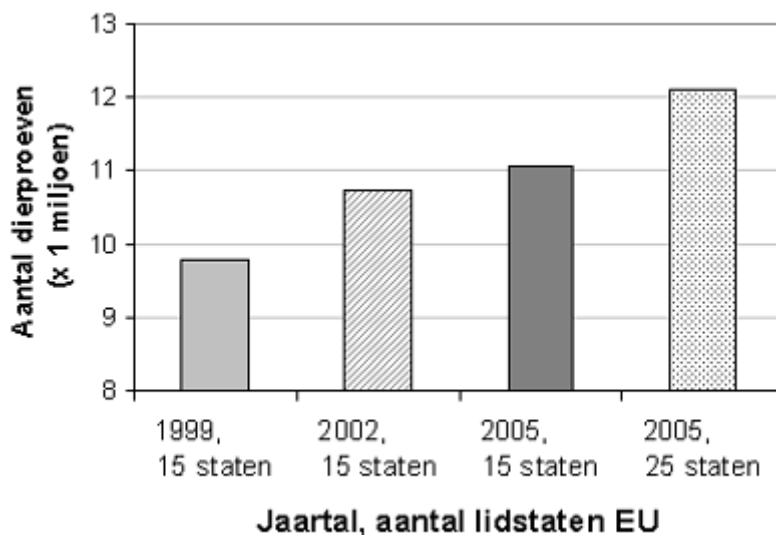
<sup>4</sup> Luuc Kooijmans. Gevaarlijke kennis, Inzichten en angst in de dagen van Jan Swammerdam. Uitgeverij Bert Bakker, Amsterdam (2007)

<sup>5</sup> In het EU Verdrag van Amsterdam (1997) wordt het dier gezien als een 'sentient being' <http://eur-lex.europa.eu/nl/treaties/dat/11997D/htm/11997D.html>

rapportages Zo doende van de Voedsel en Warenautoriteit (VWA)<sup>6</sup> is er veel bekend over ontwikkelingen in het proefdiergebruik. De grafieken 3.1, 3.3 – 3.5, 3.7 en 3.8) geven informatie over proefdiergebruik, specificatie naar onderzoeksdoel en ongerief. Waar van belang is de informatie aangevuld met cijfers van buiten Nederland, in het bijzonder vanuit de EU registratie en de registratie in de UK (Grafiek 3.2, resp. 3.6).



Grafiek 3.1: Aantal dierproeven per jaar in Nederland van 1978 tot 2008 (Bron: Zo doende 1978-2008).

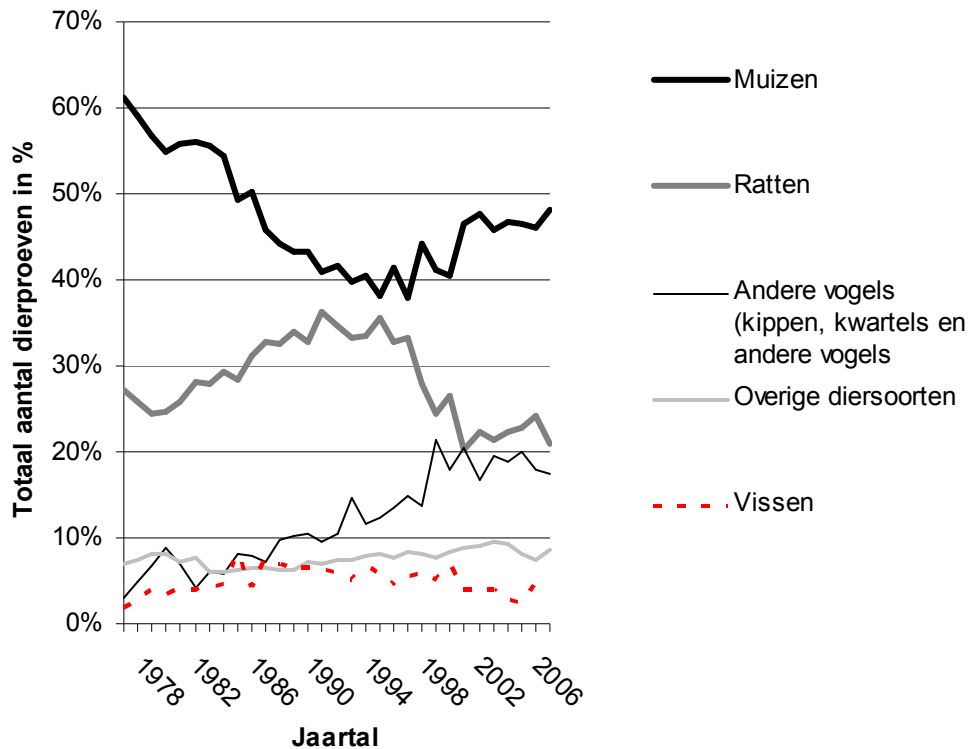


Grafiek 3.2: Totaal aantal proefdieren in de Lidstaten van de EU van 1999, 2002 en 2005<sup>\*,7,8, 9,10</sup>

<sup>6</sup> Zo doende. Jaaroverzicht over dierproeven en proefdieren. Uitgaven van de Voedsel en Waren Autoriteit (vòr 1998 door de Veterinaire Hoofd Inspectie van de Volksgezondheid)

\* Het aantal lidstaten van de Europese Unie is van gegroeid 15 tot 25 sinds 2002. Om inzicht te krijgen in mogelijke toename of afname van het proefdier gebruik binnen de EU, zijn voor 2005 de aantallen dierproeven van de oude lidstaten en het totaal aantal dierproeven van zowel "oude" als "nieuwe" lidstaten weergegeven.

Vergelijking van Figuur 3.1. met Figuur 3.2. laat zien dat het proefdiergebruik in Nederland met enkele onderbrekingen een lichte daling laten zien, terwijl het proefdiergebruik in het totaal van 15 lidstaten blijft toenemen.



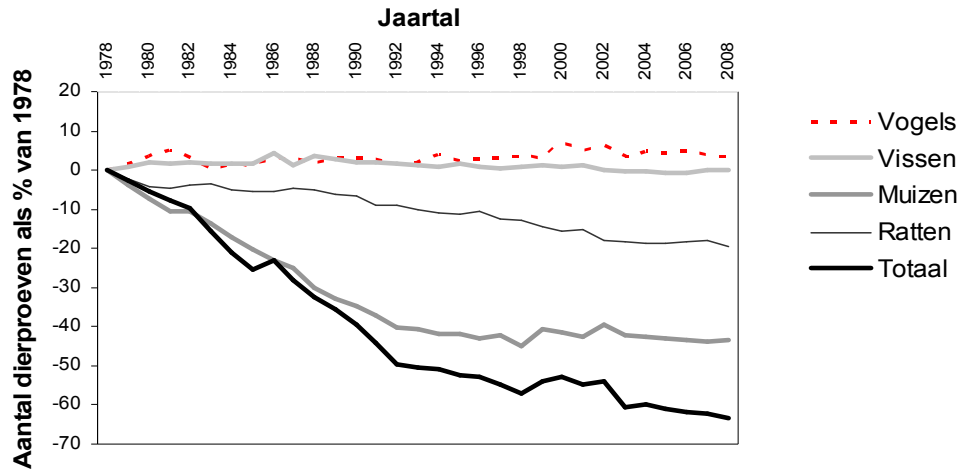
Grafiek 3.3: Meest gebruikte diersoorten voor dierproeven in Nederland (in % van totaal) vanaf 1978 tot 2008 (Bron: Zo doende 1978-2008).

<sup>7</sup> Commission of the European Communities, Second report from the commission to the council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 1999

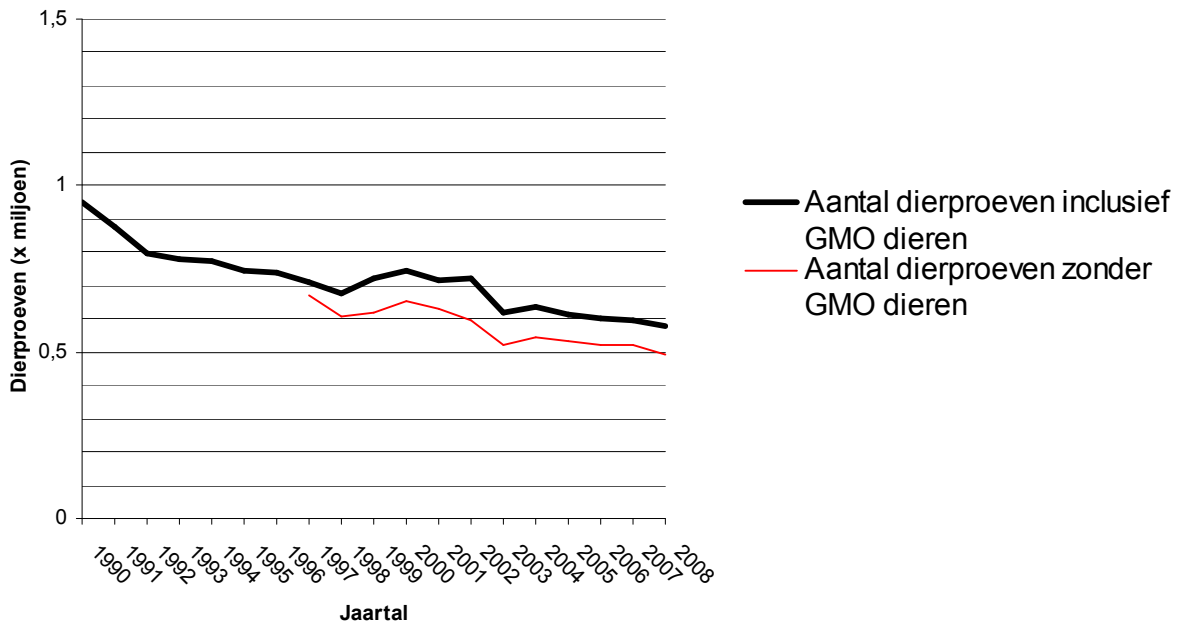
<sup>8</sup> Commission of the European Communities, Third report from the commission to the council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 2003

<sup>9</sup> Commission of the European Communities, Fourth report from the commission to the council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 2005

<sup>10</sup> Commission of the European Communities, Fifth report from the commission to the council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 2007

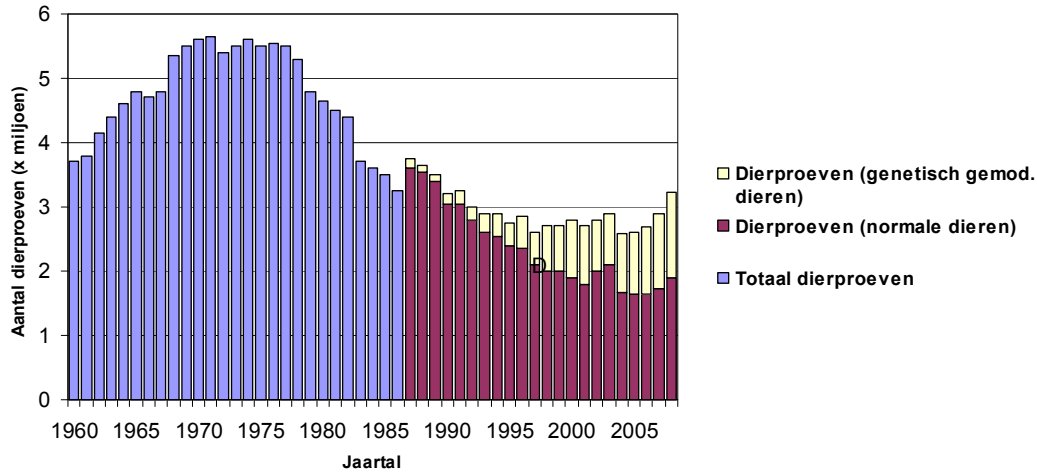


Grafiek 3.4: Meest gebruikte diersoorten voor dierproeven in Nederland procentuele afname, resp. toename t.o.v. 1978 (1978-2008).



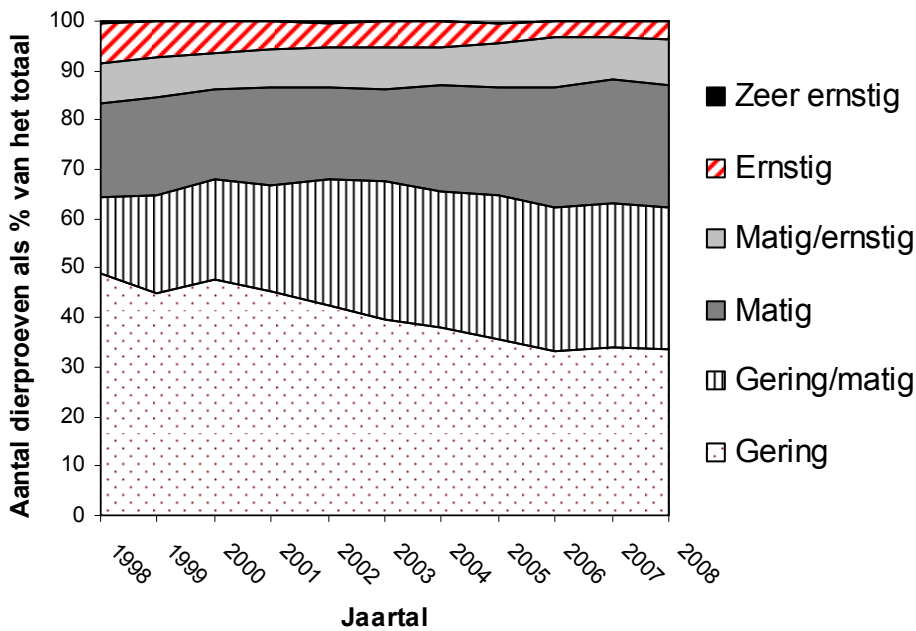
Grafiek 3.5: Proefdiergebruik in Nederland van 1990 tot 2008 met vanaf 1997 een onderscheid tussen het totaal aan dierproeven inclusief genetisch gemodificeerde (GMO) dieren en exclusief GMO dieren in Nederland (Bron: Zo doende 1990-2008).

### 3 Proefdieren



Grafiek 3.6: Aantal dierproeven met of zonder genetisch gemodificeerde dieren van 1960-2008 in het Verenigd Koninkrijk.<sup>11</sup>

Voor wat betreft het gebruik van GM dieren in Nederland en het Verenigd Koninkrijk valt op dat de verhoudingsgewijs meer GM dieren in de UK worden gebruikt en in tegenstelling tot in Nederland het gebruik van GM dieren weer toeneemt.



Grafiek 3.6: Mate van ongerief (in % van het totaal) in de periode 1998 - 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

<sup>11</sup> Home Office (2009) Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2008. London, UK: Home Office

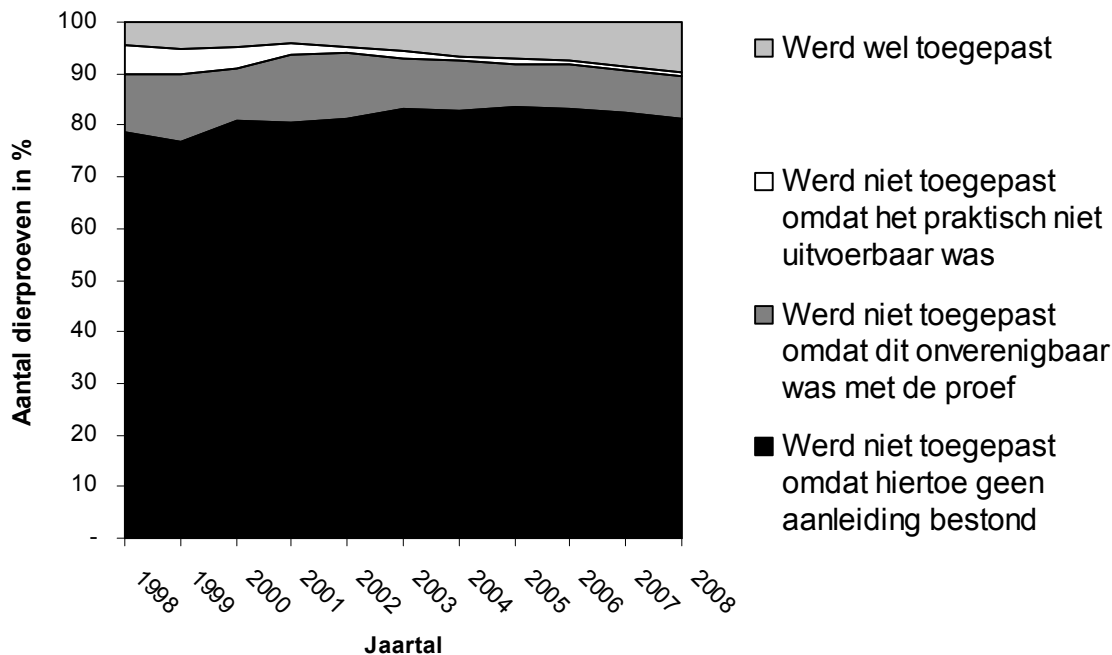
### 3 Proefdieren

Tabel 3.1: Subdoelstellingen waarvoor de meeste dierproeven zijn uitgevoerd (in percentage van totaal) in Nederland in 2008 (Bron: Zo doende 2008).

<b>Sub-doelstellingen met het grootste proefdiergebruik in Nederland als percentage van totaal van 2008</b>	<b>Aantal in % van het totale aantal dierproeven van 2008</b>
Een andere wetenschappelijke vraag	15,99%
Wetenschappelijke vraag andere ziekten bij de mens	10,56%
Ontwikkeling van geneesmiddelen tbv mens	9,22%
Wetenschappelijke vraag kanker bij de mens (exclusief het vaststellen van potentiële carcinogenen)	9,02%
Productie, controle of ijking van sera, vaccins of andere biologische producten tbv dier	8,88%
Productie, controle of ijking van geneesmiddelen tbv mens	7,98%
Wetenschappelijke vraag geestesziekten of ziekten van het zenuwstelsel bij de mens	5,58%
Wetenschappelijke vraag ziekten bij dieren	4,39%
Wetenschappelijke vraag hart- en vaatziekten bij de mens	4,18%
Ontwikkeling van sera, vaccins of ander biologische producten tbv dier	4,14%

Tabel 3.2: Subdoelstellingen waarvoor de meeste dierproeven zijn uitgevoerd in de periode 1998-2008 (berekend door het gemiddelde te nemen van de percentages van het totaal voor de jaren in de periode 1998-2008) (Bron Zo doende 1998-2008).

<b>Sub-doelstellingen met het grootste proefdiergebruik in Nederland als percentage van totaal 2008</b>	<b>Gemiddeld aantal in % van het total aantal dierproeven per jaar van 1998-2008</b>
Een andere wetenschappelijke vraag	16,07%
De ontwikkeling van geneesmiddelen tbv mens	11,41%
Wetenschappelijke vraag kanker bij de mens (exclusief het vaststellen van potentiële carcinogenen)	11,22%
Wetenschappelijke vraag andere ziekten bij de mens	9,25%
Ontwikkeling van sera, vaccins of ander biologische producten tbv dier	8,21%
Productie, controle of ijking van sera, vaccins of andere biologische producten tbv dier	7,62%
Productie, controle of ijking van geneesmiddelen tbv mens	6,67%
Wetenschappelijke vraag hart- en vaatziekten bij de mens	4,21%
Wetenschappelijke vraag geestesziekten of ziekten van het zenuwstelsel bij de mens	3,93%
Productie, controle of ijking van sera, vaccins of andere biologische producten tbv mens	3,82%



Grafiek 3.8: Toepassing pijnbestrijding (in % van het totaal) bij dierproeven in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

### 3.3 Ontwikkelingen en trends in het gebruik van proefdieren

In de volgende paragrafen zal het gaan om ontwikkelingen en trends waarbij het proefdier centraal staat. Zoals vermeld zijn deze grofweg onder te verdelen in categorieën:

- ontwikkelingen en trends die zullen bijdragen aan een grotere relevantie van het diermodel en derhalve aan een toenemend belang van het diermodel voor het onderzoek of ontwikkelingen die gericht zijn op een maximalisatie van informatie die per dier verkregen kan worden.
- ontwikkelingen en trends die gericht zijn op het verfijnen van het dierexperimenteel onderzoek, hetzij door een vermindering van het ongerief, hetzij door een maximalisatie van het welzijn van het dier.

Verder zal ook aandacht worden besteed aan de fok van proefdieren, de problematiek van het doden van dieren voor het experiment en aan wijzigingen die mogelijk zullen worden aangebracht in de wetgeving op het gebied van dierexperimenteel onderzoek.

#### 3.3.1 Verhogen van de relevantie van het diermodel

Slechts een beperkt deel van het onderzoek vindt plaats in het doeldier, dat wil zeggen in de diersoort waarvoor het onderzoek bedoeld is. Voorbeelden hiervan zijn het veldbiologische onderzoek en een deel van het onderzoek ten behoeve van de ontwikkeling en vrijgifte van veterinaire geneesmiddelen en vaccins. Meestal echter is het diermodel een surrogaat voor het doeldier (veelal de mens) en kent de vertaaltap (extrapolatie) van de resultaten uit het onderzoek een mate van onzekerheid. Extrapolatie wint aan kracht als onderliggende mechanismen van (patho)fysiologische processen begrepen worden en bij voorkeur tussen doeldier en proefdier vergelijkbaar zijn. Aandacht zal worden besteed aan de keuze van het diermodel en aan ontwikkelingen en trends in het proefdierkundig onderzoek die er

op gericht zijn kennis en inzicht in de relevantie van het diermodel op deze terreinen te vergroten en de relevantie van het diermodel voor het onderzoek te verhogen. In het bijzonder zal worden ingegaan op het gebruik van genetische gemodificeerde dieren en het gebruik van technologieën die een gerichte selectie van het meest relevante diermodel mogelijk maken.

#### Keuze diermodel

Onderzoek is het meest gediend met een uitvoering in een relevant model. Als proefdierrijke methoden om welke reden dan ook niet kunnen worden gebruikt, en de noodzaak van het onderzoek is aangetoond zou de keuze moeten vallen op het meest relevante diermodel. De consequentie van dit uitgangspunt zou een grote verscheidenheid in gebruikte diersoorten kunnen zijn. In de praktijk echter blijkt dat het in het onderzoek vooral om muizen en ratten gaat. Deels is dit toe te schrijven aan het feit dat er inmiddels veel muizen- en rattenstammen bestaan die vanuit een spontane mutatie of door gerichte kruising interessant zijn geworden voor specifieke onderzoeksvragen. Daarnaast zijn er andere factoren die de keuze van het diermodel bepalen: de relatief lage kosten en korte levensduur, de makkelijke huisvesting, de beschikbaarheid van specifieke reagentia en bovenal het feit dat veel van de knaagdiermodellen inmiddels uitvoerig gekarakteriseerd en gedocumenteerd zijn.

Door geïnterviewden worden de komende jaren dan ook geen grote verschuivingen verwacht in de keuze van de diersoort. Verschuivingen op beperkte schaal hebben vooral betrekking op een toenemend belang<sup>12</sup> van vissen binnen het onderzoek<sup>13</sup>, dit vooral binnen het (eco)toxicologisch onderzoek, de ontwikkeling en controle van visvaccins en in het fundamenteel onderzoek o.a. in de ontwikkelingsbiologie<sup>14</sup>. Beperkte verschuivingen zijn ook te verwachten door prioriteringen in het onderzoek. De toenemende druk van emerging diseases (zie ook hoofdstuk 7), in het bijzonder de verschillende Influenza varianten, hebben het belang van de fret als diermodel doen toenemen<sup>15</sup>. Voor de grote (landbouw)huisdieren geldt dat, gezien de kosten van deze modellen en de problemen rondom huisvesting, het niet in de lijn der verwachting ligt dat dit onderzoek zal aantrekken. Mogelijke uitzondering is een geringe toename in de populariteit van het minivarken, dit veelal als alternatief voor het onderzoek in primaten.

Binnen de gebruikte diersoorten nemen de primaten een bijzondere positie in. Om die reden is in deze trendanalyse dan ook een apart bijlage (bijlage 5) opgenomen over primatenonderzoek. Voor wat de keuze van de primate als onderzoeksmodel betreft kan geconstateerd worden dat deze de afgelopen jaren uitvoerig onderwerp van discussie is geweest. De meningen over de waarde van de primate als model voor onderzoek zijn verdeeld. Door sommigen wordt de relevantie van de primate als model voor de mens beperkt geacht<sup>16</sup>. Diverse rapporten<sup>17, 18, 19</sup> daarentegen komen

---

<sup>12</sup> Indicatief is het aantal hits bij het invoeren van de trefwoorden 'Fish in Biomedical research' in PubMed. Voor 2009 (tot 1 december) leverde dit 125 referenties op, voor 1999 een totaal van 38.

<sup>13</sup> Brittijn S.A., Duivesteyn S.J., Belmamoune M. et al. (2009). Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research. *Int.J.Dev.Biol.* 53(5-6): 835-850.

<sup>14</sup> Dooley K., Zon L.I., Zebrafish: A model system for the study of human disease, *Current Opinion in Genetics and Development*, 2000, 10(3): 252-256

<sup>15</sup> In 2009 (tot 1 december) gaf PubMed 58 hits voor artikelen met fretten als model voor influenza onderzoek

<sup>16</sup> Knight A. (2007) The poor contribution of chimpanzee experiments to biomedical progress. *J.Appl.Anim.Welf.Sci* 10(4): 281-308

<sup>17</sup> Weatherall report (2006). The Use of Non-Human Primates in Research  
<http://www.acmedsci.ac.uk/images/project/nhpdownl.pdf>

<sup>18</sup> European Commission (2002). The Need for Non-Human Primates in Biomedical Research.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253_en.pdf)

tot de conclusie dat zowel het fundamenteel als toegepast onderzoek niet zonder gebruik van primaten kan. Hoewel er tussen de jaren flinke

Redenen die worden genoemd voor een blijvend belang van onderzoek met primaten:

- \* Primaten worden over het algemeen ingezet voor vraagstellingen die een complexe achtergrond hebben zoals aandoeningen van het immuunsysteem of van het centrale zenuwstelsel. Het belang van dit type onderzoek zal toenemen, onder andere vanwege de vergrijzing van de bevolking;
- \* Primaten worden vooral gebruikt in het eindstadium van het onderzoek waarbij toetsing in een complex organisme met een grote verwantschap aan de mens essentieel is. Dit geldt ook voor nieuwe vormen in de behandeling van ziekten zoals de toepassing van monoclonale antistoffen;
- \* Primaten zijn voor een aantal vraagstellingen het enige model dat beschikbaar is omdat diermodellen die verder van de mens afstaan problemen met immunocompetentie een rol gaan spelen;
- \* Primaten zijn, zeker de in gevangenschap gefokte dieren, bijzonder goed gekarakteriseerd (genetisch, microbiologisch, gezondheid) en daardoor een aantrekkelijk model voor specifieke vragen.

schommelingen optreden in het gebruik van primaten in Nederland, wordt uit figuur 1 uit bijlage 3 duidelijk dat over de jaren heen het gebruik vrij stabiel is. In sommige landen, zoals de VS, wordt het gebruik de afgelopen jaren zelfs gekenmerkt door een toename.

De geïnterviewde deskundigen delen de mening over onmisbaarheid, zowel voor het fundamenteel als voor het toegepaste onderzoek. Zo wordt de groeiende ontwikkeling van humaan specifieke farmaceutica, zoals immuno modulerende antilichamen, als een trend gezien. Voor het veiligheidsonderzoek van dit soort farmaceutica worden vooral primaten gebruikt<sup>20</sup>. Men ziet dan ook de komende jaren geen grote veranderingen optreden in het gebruik van primaten.

#### Vergroten van de relevantie van het diermodel.

Inherent aan het onderzoek is het streven onderzoeksmodellen te perfectioneren in de zin dat ze meer toegesneden zijn op vraagstelling van het onderzoek. In het verleden was men aangewezen op spontane genmutaties waardoor dieren interessant bleken voor specifieke onderzoeksvragen. Een voorbeeld daarvan is de BB diabetes prone (BBdp) rat voor het onderzoek op suikerziekte. Het scala aan modellen is verder uitgebreid door toepassing intelligente kruisingsprogramma's waardoor congene stammen, recombinant inteelt stammen en chromosoom substitutie (consomic) stammen beschikbaar kwamen.

Momenteel zijn het vooral de ontwikkelingen vanuit de moleculaire biologie die hieraan een bijdrage leveren aan het verbeteren van de relevantie van diermodellen. Nieuwe technologieën als transcriptomics en proteomics zullen duidelijkheid kunnen verschaffen over de moleculair biologische aspecten van species verschillen en de pathofysiologische processen die hieraan gerelateerd zijn. Kennis hierover maakt het mogelijk de selectie van het relevante diermodel te laten leiden door overeenkomsten in betrokken genen of eiwitten. In belangrijke mate zal dit de problematiek van extrapolatie van modeldier naar doeldier en het interpreteren van modeldier – doeldier verschillen inzichtelijker maken<sup>21</sup>. Het gebruik van

---

<sup>19</sup> Pieters F. (2007). Non-human primates in biomedical research.

<http://www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel/content/publicaties/pub-dierenwelz.html>

<sup>20</sup> Muller, P.Y., Brennan, F.R., Safety Assessment and Dose Selection for First-in-Human Clinical Trials With Immunomodulatory Monoclonal Antibodies, *Clinical Pharmacology*, 2009, 85(3): 247-258

<sup>21</sup> Netherlands Genomics Initiative (2004). Genomics & Alternatives to Animal Use. Publimarket, Den Haag

genomics voor interspecies vergelijking staat momenteel nog in de kinderschoenen. Gezien echter de snelheid waarmee voortgang wordt geboekt, mag verwacht worden dat er over 10 jaar praktische toepassingen mogelijk zijn.

Een andere strategie om de relevantie van diersmodellen te vergroten is het gebruik van genetische modificaties waarbij nieuwe (bijvoorbeeld humane) genen kunnen worden ingebouwd in het genoom van het dier (transgene) of eigen genen juist worden uitgeschakeld (knockout). Hierdoor is het mogelijk in een proefdier specifieke humane ziektemodellen te induceren of door het uitschakelen de functie van de betreffende genen te bestuderen. Genetisch gemodificeerde (GM) dieren worden gebruikt in een groot aantal disciplines van het onderzoek. Invoeren van de zoekterm 'transgenic animals' in PubMed levert 132.500 hits op waarvan ruim 9000 voor 2009 (17-12-2009).

Door de geïnterviewden wordt de introductie van GM dieren in het onderzoek als belangrijkste reden genoemd voor de stabilisatie en zelfs toename in het proefdiergebruik vanaf midden jaren negentig. In 2008 wordt het aantal beschikbare GM lijnen al op circa 30.000 geschat<sup>22</sup> en het aantal zal verder toenemen is de verwachting. Van een groeiend aantal dieren is het genoom in kaart gebracht en de beschikbaarheid van GM lijnen is verbeterd.

Tot voor kort werd genetische modificatie vrijwel uitsluitend toegepast in de muis. In toenemende mate worden echter ook andere diersoorten gebruikt. In opkomst is de transgene vis, dit vooral na het beschikbaar komen van de genoom sequenties. Vergrote aandacht bestaat er ook voor het konijn en de rat, hoewel genetische modificatie van de laatste diersoort nog technische problemen kent. Nieuw lijkt het gebruik van grotere diersoorten<sup>23,24</sup>. Achterliggende gedachte is dat deze modellen voor een aantal onderzoeksgebieden relevanter zijn dan knaagdiersmodellen. Door transgenese waarbij humane genen in het genoom worden ingebracht zal de relevantie van het model, zo is de hypothese, verder toenemen. Bij grotere diersoorten kan aan schaap of aap gedacht worden, maar de meeste aandacht gaat momenteel uit naar het (mini)varken. Het varken lijkt voor wat betreft het cardiovasculaire systeem en maag-darmstelsel op de mens en er is relatief veel over bekend. Daarnaast is het transgene varken een interessant model voor xenotransplantatieonderzoek.

De geïnterviewde deskundigen zijn verdeeld over de waarde van GM dieren voor het onderzoek. Hoewel het belang van GM modellen voor specifieke (ziekte)processen wordt erkend, worden ook de wetenschappelijke beperkingen van deze modellen benadrukt. Technisch is transgenese alleen mogelijk met een beperkt aantal genen, zonder dat instabiliteit van het genoom optreedt. Veel (ziekte) processen hebben echter een multigenetische basis waardoor compensatie mechanismen in stand blijven. Verder vindt transgenese plaats tegen de achtergrond van het proefdiergenoom. 'Humanisatie' van het proefdier, door het inbrengen van humane genen is derhalve een betrekkelijk begrip. Daarnaast zijn zaken als ethiek, geld en tijd belemmerende factoren<sup>25</sup>. Voor het maken, fokken en aanhouden van een transgene lijn zijn veel dieren nodig, de kosten voor het maken en aanhouden van

---

<sup>22</sup> Hagn M., Marchall S., Hrabè de Angelis M. (2007). EMMA – The European mouse mutant archive. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.* 6: 186-192.

<sup>23</sup> Sasaki E. et al. (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission, *Nature* 459 (7246): 523-527.

<sup>24</sup> Gómez M.C. et al. (2009). Generation of domestic transgenic cloned kittens using lenti virus vectors. *Cloning Stem Cells* 11(1): 167-176.

<sup>25</sup> Huang K-Y. (2009). Archiving biomedical Mouse models by ovary cryopreservation. Thesis. Drukkerij Ridderprint, ISBN 978-90-393-5208-3

lijnen zijn hoog en het maken van een transgene lijn kost al snel meer dan een jaar. Wel kan het gebruik van GM modellen een belangrijk hulpmiddel zijn om informatie over de specifieke werking van een bepaald gen te verzamelen. In die zin spelen GM dieren een rol bij het onderbouwen van de hypothese vorming over (moleculair) biologische processen in het lichaam.

Bij genetische modificatie door middel van transgenese worden met behulp van biotechnologische technieken erfelijke eigenschappen veranderd of van het ene naar het andere organisme overgebracht. Daarbij kan de natuurlijke barrière tussen soorten overschreden worden. Wanneer de nieuwe genetische informatie terechtkomt in de kiembaan en vervolgens van de ene op de andere generatie wordt doorgegeven, ontstaan transgene dieren. Er zijn verschillende methoden voor transgenese. De meest gebruikte is de micro-injectie techniek, waarbij een genconstruct met behulp van een micropipet in één van de twee voorkernen van een bevruchte eicel wordt geïnjecteerd. De techniek is redelijk efficiënt, maar de plaats van integratie in het genoom is willekeurig. Een andere veel toegepaste techniek is gene-targeting, waarbij gebruik gemaakt wordt van embryonale stamcellen (ES cellen). Hierbij worden pluripotente ES-cellen uit een (pre-implantatie) embryo genetisch veranderd. Via homologe recombinantie kan een genconstruct uitgewisseld worden tegen een eigen gen. De plaats van integratie is daarmee bepaald. De cellen worden vervolgens weer ingebracht in de blastocoelholte van een (ander) embryo. Er kunnen ook zogenaamde 'knock-out' dieren worden gemaakt, waarbij via homologe recombinantie een gen naar keuze wordt uitgeschakeld. Hierdoor kan meer inzicht verkregen worden in de oorspronkelijke functie van het gen<sup>26</sup>. Door middel van de techniek van Cre-lox recombinatie is het mogelijk een "targeted" gen pas later met behulp van een enzym (Cre-recombinase) uit te schakelen. Het uitschakelen van een gen kan als zodanig op een door de onderzoeker te bepalen tijdstip (bijvoorbeeld op volwassen leeftijd) gebeuren (conditional knockout)

#### 3.3.2 Maximalisatie van informatie per dier

Maximalisatie van informatie kan bereikt worden door per dier de diversiteit aan biomarkers te vergroten en/of de frequentie waarmee deze biomarkers worden afgelezen te laten toenemen.

#### Het gebruik van niet invasieve technieken

Een groot aantal beeldvormende technieken kunnen onder deze categorie geplaatst worden: CT-scans (computertomografie), SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), PET (positronemissietomografie), MRI (Magnetic Resonance Imaging), Optical Imaging, Bioluminescentie en Ultrasound. Voor een uitgebreid overzicht van deze technieken wordt verwezen naar ILAR Journal Volume 49(1)27. Niet invasieve technieken worden in toenemende mate in het dierexperimenteel onderzoek gebruikt, zowel voor fundamentele als voor toegepaste vraagstellingen. Zo kan informatie verkregen uit niet-invasieve technieken bijdragen aan het ophelderen van de fysiologie van de hartspier, het impuls verloop in neurale netwerken (bijvoorbeeld via MRI of CT scan) of aan het volgen van de ontwikkelingen van (ziekte)processen (bijvoorbeeld Bioluminescentie en PET). Voorbeelden van onderzoeksgebieden waarbij beeldvorming van belang is zijn ziektemodellen voor longaandoeningen (bijvoorbeeld longoedeem, emphyseem, astma) of het kanker onderzoek en het onderzoek naar pathogene micro-organismen. Informatie verkregen met niet-invasieve meetmethoden kan ook gebruikt worden voor het genereren van computergestuurde simulatiemodellen. Dit

---

<sup>26</sup> Van der Meer M. (2001). Transgenesis and animal welfare. Thesis, Labor Grafimedia BV, Utrecht. ISBN 90-393-2844-7

<sup>27</sup> ILAR Journal Volume 49(1), 2008. Noninvasive bioimaging of Laboratory Animals

kan tot inzichten leiden in bijvoorbeeld de kaakontwikkeling in relatie tot uitgeoefende krachten<sup>28</sup>.

Bioluminescentie berust op een techniek waarbij een luciferase gen wordt ingebouwd in bijvoorbeeld het genoom van een tumorcel of pathogeen micro-organisme<sup>29</sup>. Het luciferase gen codeert voor de productie van specifieke (fluorescentie) eiwitten die weefseldoordringbaar licht produceren binnen het zichtbare spectrum. Door middel van specifieke apparatuur kan het licht worden waargenomen en kunnen van buiten het dier opnames worden gemaakt. Deze techniek maakt het mogelijk in het dier tumorgroei en metastasering te volgen of verspreiding van het pathogene micro-organisme in de tijd.

Een indicatie voor het toenemende belang van bioluminescentie blijkt bij intoetsing van de trefwoorden 'Bioluminescence imaging' in PubMed. In 2002 leverde dit 26 wetenschappelijke artikelen op, in 2008 waren dit er al 207.

Momenteel is aanschaf en gebruik van beeldvormende technieken nog een kostbare aangelegenheid en zijn sommige methoden te weinig gevoelig. Verwacht wordt echter dat bij een toenemend gebruik de kosten zullen afnemen en een voortgaande technische ontwikkeling voor een verdere optimalisatie zal zorgen. Bijkomend voordeel van beeldvormende technieken is de mogelijkheid het aantal dieren te reduceren doordat dieren als eigen controle fungeren, nadeel is vaak het feit dat dieren dienen te worden vervoerd naar de opstellingen en onder anesthesie moeten worden gebracht voor de metingen (waarbij reductie in aantallen dieren kan leiden tot toename van het ongerief voor de individuele dieren). Daarnaast is de apparatuur moeilijk onder specifieke huisvestingsomstandigheden te gebruiken (bijvoorbeeld in relatie tot proeven met een microbiologische inperking).

#### Het gebruik van real-time monitoringstechnieken

Real-time monitoring heeft betrekking op een continue meting van (patho)fysiologische parameters in de tijd, zoals bloeddruk, hartslag, lichaamstemperatuur, of op het volgen van pathologische veranderingen met behulp van niet invasieve methoden. Voor de (patho)fysiologische veranderingen wordt vaak gebruikt gemaakt van telemetrie waarbij een zender wordt ingebracht in een lichaamsholte en radiografische overdracht van data plaatsvindt naar een externe ontvanger. Variaties op dit systeem zijn mogelijk<sup>30</sup>. Een voorbeeld van een niet invasieve monitoringsysteem is de bovengenoemde bioluminescentie techniek. Telemetrische systemen kunnen in principe 24 uur per dag informatie doorgeven naar de ontvanger, maar om de batterij van de zender te sparen worden systemen met een magnetische schakelaar aan- en uitgezet. Real-time monitoringstechnieken worden in toenemende mate gebruikt in vooral het (patho)fysiologisch onderzoek en in het farmacologisch onderzoek. Ontwikkelingen met betrekking tot telemetrische systemen zullen zich de komende jaren vooral richten op een miniaturisatie van de zender en op het uitontwikkelen van apparatuur waarbij dieren sociaal kunnen worden gehuisvest. Dit is al wel mogelijk voor grotere proefdieren, maar nog niet voor de apparatuur gebruikt in muis en rat. Daarnaast is de verwachting dat de computer software voor verwerking en analyse van gegevens zal verbeteren.

Radiografische apparatuur wordt eveneens gebruikt bij het monitoren van trekbewegingen van dieren in het wild. Verwacht wordt dat dit type onderzoek zal

---

<sup>28</sup> Hansma H.J., Langenbach G.E., Koolstra J.H. and Van Eijden T.M. (2006). Passive resistance increases differentially in various jaw displacement directions. *J.Dent* 34(7): 491-497.

<sup>29</sup> Kamath V. et.al. (2008). Towards a framework for analysis of biophotonic images of mouse models of cancer. *Conf.Proc.IEEE Eng.Med.Biol.Soc* .3079-3082.

<sup>30</sup> Kramer K. & Kinter L.B. (2003). Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals, *Physiol Genomics* 13(3): 197-2005.

aantrekken, onder andere in het kader van het onderzoek naar het verspreidingsverloop van pandemische ziekten (zie ook 7.9.4).

### 3.3.3 Ontwikkelingen en trends gericht op Verfijning in het gebruik van proefdieren

Ontwikkelingen en trends die bijdragen aan verfijning van proefdiergebruik richten zich op een vermindering van het ongerief of op het maximaliseren van het welzijn van proefdieren. Omdat educatie en training hierin een belangrijke rol spelen zal hieraan afzonderlijk aandacht worden besteed.

#### Verminderen van het ongerief

Grafiek 3.6 geeft een overzicht van de categorieën van ongerief in het dierexperimenteel onderzoek in de periode 1998 tot 2008. Uit de grafiek valt op te maken dat naast een afname van het percentage experimenten met ernstig ongerief er ook een afname is van het percentage experimenten met gering ongerief, terwijl er verhoudingsgewijs een toename is in de categorieën gering/matig en matig. Voorzichtigheid is nodig bij het verbinden van conclusies aan deze gegevens. Inschatting van ongerief berust op een subjectief oordeel en verschuivingen in de inschatting kunnen ook te maken hebben met een veranderde kijk op ongerief. Door betrokkenen uit het veld wordt aangegeven dat dit inderdaad het geval lijkt te zijn. Grafiek 3.8 geeft informatie over het aantal dierproeven met ongerief waarbij geen pijnbestrijding is toegepast, waarbij dit percentage in de afgelopen jaren is afgenomen, vooral in die experimenten waarin praktische uitvoerbaarheid een beperkende factor was.

Optimalisatie van pijnbestrijding is een trend die zich de komende jaren voortzet. Progressie zal eerder bestaan uit een kritische evaluatie van onderzoeksprotocollen waarin pijn een bijkomend fenomeen is dan uit de ontwikkeling van nieuwe analgetica. Uit onderzoek blijkt dat pijn en ongerief een modulerend effect (zowel kwalitatief als kwantitatief) op experimentele resultaten kan hebben<sup>31</sup> en daardoor een experimentele bias vormt zoals ook (subklinische)infecties dat kunnen zijn. Een ondersteunende trend is het nader identificeren van gedragsparameters en fysiologische biomarkers die voor de inschatting van ongerief gebruikt kunnen worden. Mogelijk kunnen ook ontwikkelingen op het vlak van de genomics hierin een rol spelen<sup>32</sup>.

Een toenemende kritische houding met betrekking tot ernstig ongerief in experimenten is te verwachten. Onderzoek in Engeland<sup>33</sup> heeft laten zien dat de publieke acceptatie van dierexperimenteel onderzoek daalt als dit onderzoek gerelateerd is aan ernstig ongerief. Ook binnen de onderzoekswereld groeit de aandacht voor het terugdringen van ongerief. Naast ethische overwegingen liggen hieraan ook wetenschappelijke overwegingen ten grondslag. Zoals boven beschreven kan ongerief een verstoring element zijn op experimentele resultaten. Het vinden van vroege (zogenaamde 'humane') eindpunten zal in de komende jaren dan ook in belang toenemen<sup>34,35</sup>. Een aanwijzing hiervoor is het feit dat het begrip 'Humane eindpunten' en de noodzaak om humane eindpunten te gebruiken, is

---

<sup>31</sup>Verwer C.M., van der Ark A., van Amerongen G. et al.(2009). Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling. *Lab.Animal*. 43(2): 155-164.

<sup>32</sup>Heindl-Erdmann C., Axmann R., Kreitz S. et al. (2009). Combining functional magnetic resonance imaging with mouse genomics: new options in pain research. *Neuroreport*

<sup>33</sup>Aldhous P., Coghlan A., Copley J. (1999). Let the people speak. *New Scientist*, 22: 26 – 31

<sup>34</sup>ILAR Journal (2000). Humane endpoints for animals used in biomedical research and testing. V41 (2)

<sup>35</sup>Hendriksen C. and Morton D. eds. (1999). Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. The Royal Society Medicine Press, London (UK). pp. 106-113.Humane endpoints in Biomedical research.

opgenomen in de concept tekst van de revisie van de Europese Richtlijn 86/609/EEC. Op korte termijn zal een website gelanceerd worden die specifiek informatie zal verschaffen over humane eindpunten<sup>36</sup>.

#### Verhoging van het welzijn

Verhoging van welzijn kan bestaan uit het optimaliseren van huisvestingscondities door deze, binnen de grenzen van het mogelijke, in overeenstemming te brengen van diersoort specifieke condities, uit het sociaal huisvesten van sociaal levende dieren, het beschikbaar stellen van kooiverrijkingmaterialen of het trainen van dieren voor bepaalde handelingen als bloedafnames door positieve conditionering. Onder geïnterviewden bestaat de indruk dat de grote stappen in de verhoging van het welzijn inmiddels gezet zijn en dat de komende periode vooral gericht zullen zijn op implementatie en fine-tuning. Recent zijn nieuwe richtlijnen voor de huisvesting van proefdieren gepubliceerd door de Raad van Europa (Appendix A van de European Convention ETS123<sup>37</sup>)

#### *3.3.4 Educatie en training*

'Het beste alternatief voor dierproeven zijn de hersenen van de onderzoeker' is een geveugelde uitspraak in het proefdierkundig veld. De kern van waarheid in deze uitspraak is groot. Hoewel er in Nederland een strak systeem van toezicht op dierproeven bestaat door proefdierdeskundigen, biotechnische medewerkers, dierexperimentencommissies, en inspecties, is het uiteindelijk de individuele onderzoekers en de attitude van die onderzoeker die verantwoordelijk is voor opzet en uitvoering van een dierproef. Onderzoekers die met proefdieren willen werken, dienen naast een relevante biomedische opleiding de 2 weekse cursus Proefdierkunde gevolgd te hebben. De verwachting is dat deze voorwaarden ook zullen worden opgenomen in de lopende revisie van de Europese Directive 86/609/EEC. De bevoegdheid is niet gebonden aan een termijn. In de komende jaren mag verwacht worden dat het systeem van autorisatie zal worden verscherpt. In de revisie van de EU Directive wordt gesproken over een geldigheidstermijn van 5 jaar, waarna een beslissing genomen moet worden over een verlenging. De condities waaraan de verlenging wordt opgehangen, staan niet vermeld. Aangenomen mag worden dat EU/lidstaten hierin enige vrijheid zullen krijgen. Gedacht kan worden aan een nascholing die gerelateerd is aan het curriculum van de individuele onderzoeker waarbij diverse opties mogelijk zijn. Zo zou een periode van afwezigheid uit het dierexperimenteel onderzoek kunnen resulteren in een advies de cursus Proefdierkunde nogmaals te volgen. Bij verleggen van het onderzoek naar een andere diersoort of het introduceren van nieuwe technieken, als bijvoorbeeld microchirurgie, zou de onderzoeker verplicht kunnen worden zich hierin bij te scholen. Attitude vorming kan ook langs andere wegen bereikt worden. Zo wordt in de Kabinetsvisie Alternatieven voor dierproeven (2007) voorgesteld om aan proefschriften waarin dierexperimenteel onderzoek wordt beschreven, in een ethische paragraaf in te gaan op nut en noodzaak van de verrichte dierproeven en een toelichting te geven op gemaakte afwegingen en keuzes in het kader van 3V.

Voor leden in een dierexperimentencommissie worden momenteel door de NVDEC eisen van deskundigheid opgesteld. Verwacht wordt dat deze de komende jaren zullen worden geïntroduceerd.

---

<sup>36</sup> <http://www.humane-endpoints.info/eng>

<sup>37</sup> European Convention <http://scienceandresearch.homeoffice.gov.uk/animal-research/publications-and-reference/publications/code-of-practice/code-of-practice-housing-care/annex-a-ets123?version=1>

#### 3.3.5 Wetgeving met betrekking tot het gebruik van proefdieren

Ten tijde van de projectrapportage (november 2009) verkeerde de afronding van de revisie van Directive 86/609/EEC<sup>38</sup>, de wetgeving in de Europese Unie die zich richt op het gebruik van proefdieren, in een afrondende fase. De gewijzigde wetgeving zal door de Raad van Ministers en het Europees Parlement moeten worden geaccordeerd voordat de revisie wetgevend wordt. De voorgestelde wijzingen zijn zodanig dat een aanzienlijke invloed op het gebruik van proefdieren aannemelijk lijkt, mogelijk minder voor Nederland dan voor een groot aantal andere EU Lidstaten.

Aan de revisie is vanaf 2002 gewerkt. Allereerst zijn door een aantal werkgroepen inhoudelijke voorstellen gedaan met betrekking tot het gebruik van primaten, doel van wetgeving en definities, autorisatie van onderzoek, ethische afwegingen, een kosten-baten analyse en aan ongerief. Aan EFSA's Panel on Animal Health and Animal Welfare is advies gevraagd over het opnemen in de nieuwe wetgeving van ongewervelde dieren en foetale en larvale vormen, over methoden voor euthanasie, over pijn en ongerief en over de mogelijkheden om alleen dieren te gebruiken die specifiek voor onderzoek gefokt zijn. Daarnaast zijn 2 publieke enquêtes uitgevoerd; een burger enquête (met 42.000 respondenten) en een expert enquête met 283 respondenten (vaak koepelorganisaties zoals EFPIA, ESF en FELASA) en 12.000 specifieke commentaren en wijzigingsvoorstellen. In de aan het Europees Parlement toegestuurde versie waren een totaal aan 161 amendementen toegevoegd. Sommigen daarvan waren gebaseerd op uitgewerkte voorstellen van betrokken organisaties, zoals van de European Science Organisation<sup>39</sup>.

Heeft de bestaande Directive 86/609-EEC die uit 1986 stamt, als uitgangspunt het wegnemen van handelsbelemmeringen tussen de EU Lidstaten, in de revisie is hieraan de bescherming van het proefdier toegevoegd. Proefdieren worden gezien als 'sentient beings'<sup>40</sup> en in de voorgestelde wetsteksten worden uitgebreide voorwaarden gesteld aan het gebruik van proefdieren. Voorbeelden hiervan zijn de specifieke wetsteksten over het toepassen van pijnbestrijding, het humaan doden van dieren, de toepassing van humane eindpunten, de opleiding van hen die bij dierexperimenteel onderzoek betrokken zijn en aan het op lokaal niveau instellen van "Animal welfare bodies". Ook is het toepassingsgebied van de Directive uitgebreid; van het toegepast onderzoek in de Directive uit 1986 tot het gebruik van proefdieren voor alle doeleinden van onderzoek, inclusief het gebruik van dieren in onderwijs/training en productiedieren, alsmede de proefdieren in fok en in voorraad. Daarnaast vallen Cephalopoden, Decapoden (infraorders Barchyura en Astacidea), vrij levende larvale vormen van gewervelde dieren en gewervelde dieren in ontwikkelingsstadia vanaf 2/3 van de normale ontwikkeling onder de bescherming van de wet. In de revisie geldt een verbod op het gebruik van mensapen en zijn beperkingen gesteld aan het gebruik van andere apen. Zo mogen geen dieren worden gebruikt die afkomstig zijn uit het wild of die geboren zijn uit apen gevangen in het wild. Verder worden in het revisie voorstel eisen gesteld aan de ethische beoordeling van onderzoeksprotocollen en aan rapportage na afloop van het experiment. Ten slotte gaan wetsteksten over het instellen van National animal welfare and ethics committees en het bevorderen en institutionaliseren van een 3V beleid, inclusief het instellen van referentie laboratoria en het aanwijzen van gekwalificeerde laboratoria voor validatie studies. Naast de Europese Directive 86/609/EEC is momenteel ook US Guide for the Care and Use of Laboratory

---

<sup>38</sup> Council of the European Union. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Inter-institutional File 2008/0211 (COD), 13784/09 of October 5, 2009.

<sup>39</sup> European Science Foundation (ESF). ESF-EMRC Position of the Proposal for a Directive on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. <http://www.esf.org/publications/position-papers.html>

<sup>40</sup> Treaty of Amsterdam (1997). <http://eur-lex.europa.eu/nl/treaties/dat/11997D/htm/11997D.html>

Animals<sup>41</sup> onder revisie. Hoewel niet wetgevend wordt de Guide als referentie document gebruikt door de NIH, de belangrijkste financier van wetenschappelijk onderzoek in de US.

Zonder naar specifieke wetgeving te verwijzen werd door sommige van de geïnterviewden wel gewezen op mogelijke negatieve effecten van een te strakke en te repressieve wetgeving. 'Export' van onderzoek naar landen waar minder wetgeving is, wordt als mogelijke consequenties genoemd, Aangegeven wordt dat dit zich zal vertalen in zowel een verlies van kwaliteit van onderzoek in ons land als in een verslechtering van het welzijn van proefdieren omdat experimenten elders onder suboptimale condities worden uitgevoerd.

#### 3.3.6 Overtolligheid en ongeschiktheid proefdier

Uitzonderingen daargelaten (voor gebruik van dieren uit het wild dient een ontheffing te worden aangevraagd) worden proefdieren speciaal voor onderzoeksdoeleinden gefokt. Afstemming van de fok op de behoefte wordt gekenmerkt door een spanningsveld. Een te beperkte fok leidt tot stagnatie in het onderzoek, een te omvangrijke fok tot 'overtolligheid'. De praktijk leert dat zelfs een goed afgestemde fok tot surplus dieren leidt die veelal worden gedood. Aan het onderzoek worden vaak specifieke eisen gesteld zoals leeftijd, gewicht of sekse van de dieren. Dieren die niet aan deze eisen voldoen kunnen vaak niet voor andere doeleinden worden gebruikt. Doden van dieren voor de proef is als probleem groter geworden met de komst van GM dieren. Bij enkelvoudige transgene nakomelingen, maar nog meer bij dubbele transgenen zal een significant deel van de dieren ongeschikt zijn voor onderzoek omdat ze niet de juiste genetische achtergrond hebben. Omdat het aantal transgene lijnen groter wordt en de technische mogelijkheden om dubbel en triple transgene dieren te maken toeneemt, zal het probleem van overtolligheid in de toekomst eerder toe- dan afnemen.

Bij gedood vanwege overtolligheid of ongeschiktheid gaat het om aanzienlijke aantallen dieren; in 2008 om circa 455.000 dieren<sup>42</sup>. Strategieën om deze negatieve effecten te beperken zijn divers en kunnen variëren tussen het centraliseren binnen een instelling van de fok en het aanwijzen van fokcoördinatoren, tot het cryopreserveren van stammen<sup>43</sup> die tijdelijk niet gebruikt worden of het betrekken van speciale stammen uit banken waar cryopreservatie en centrale opslag van muismutanten mogelijk is. Doel is uiteindelijk alle beschikbare mutanten vanuit de mutanten banken aan onderzoekers te kunnen leveren. Een Europees initiatief op dit gebied is EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program), een FP6 project. Andere initiatieven op dit gebied zijn EMMA (European Mouse Mutant Archive), KOMP (Knockout Mouse Project).

### 3.4 Samenvatting

In deze trendanalyse over dierproeven en alternatieven voor dierproeven wordt het proefdier als een zelfstandig domein beschouwd. Eigenschappen van het proefdier, zoals gezondheid, microbiologie en genetische status, bepalen zijn instrumentele waarde voor het onderzoek. Aan de andere kant is aan het proefdier een intrinsieke waarde toegekend waardoor het onderdeel is van morele afwegingsprocessen.

---

<sup>41</sup> Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), National Academy of Sciences, Washington (US). [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarhome/guide.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/guide.shtml)

<sup>42</sup> Zo doende 2008. VWA.

[http://www.vwa.nl/portal/page?\\_pageid=119,1639827&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&p\\_file\\_id=44543](http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639827&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_file_id=44543)

<sup>43</sup> Huang K-Y. (2009). Archiving biomedical mouse models by avary cryopreservation. Thesis, Drukkerij Ridderprint, Ridderkerk, ISBN 978-90-393-5208-3.

Dit dualistische beeld dat van het proefdier bestaat, weerspiegelt zich in actuele en mogelijk toekomstige ontwikkelingen en trends. Enerzijds doen zich ontwikkelingen voor die het proefdier tot een beter en beter begrijpbaar model maken voor het onderzoek. Dit geldt bijvoorbeeld voor het genereren van GM dieren. Anderzijds bestaat er een toenemende belangstelling (zowel maatschappelijk als wetenschappelijk) voor een verfijning van het onderzoek met proefdieren en wordt gewerkt aan een beperking van het ongerief en een verbetering van het welzijn van de dieren. Dominante trends in het totaal overzicht is de toename in aantallen GM modellen, het gebruik van beeldvormende technieken en het belang van dierwelzijn.

In Hoofdstuk 8 van dit rapport zijn de voornaamste ontwikkeling en trends met betrekking tot proefdieren samengevat (Tabel 8.1.). Er wordt een verwachting uitgesproken over de status van de ontwikkeling in 2020, de peildatum van deze studie. Verder worden mogelijke factoren genoemd die trends kunnen sturen of afremmen.



## 4 Dierproeven: ontwikkelingen en trends

### 4.1 Inleiding

In het voorgaande hoofdstuk stond het proefdier centraal in de bespreking van wetenschappelijke ontwikkelingen en trends in het onderzoek. In dit hoofdstuk zal het om de proeven gaan waarin deze dieren worden gebruikt. Overeenkomstig (art.1) van de Wod wordt onder een *dierproef* of *proef* verstaan: *'het geheel van handelingen, dat ten aanzien van een levend gewerveld dier, dan wel een levend ongewerveld dier van een bij algemene maatregel van bestuur aangewezen soort, wordt uitgevoerd met het doel:*

- a. *sera, vaccins, diagnostica of andere medische, veterinaire of biologische zelfstandigheden te produceren of te controleren, of biologische ijkingen uit te voeren,*
- b. *toxicologisch of farmacologisch onderzoek te verrichten,*
- c. *zwangerschap, ziekelijke of andere lichamelijke toestanden of lichamelijke kenmerken van mensen of dieren of overeenkomstige toestanden of kenmerken van planten te herkennen of op te sporen, anders dan in de uitoefening van de diergeneeskunde op het betrokken dier,*
- d. *kennis van het menselijke of dierlijke lichaam, of handvaardigheid in het verrichten van ingrepen daarop, te verschaffen of te ontwikkelen, of*
- e. *een antwoord te verkrijgen op een wetenschappelijke vraag.'*

Voor de categorieën a, b en e) wordt een verdere uitsplitsing gegeven in subdoelen. In 2008 waren 87 instellingen in Nederland in het bezit van een vergunning om dierproeven te verrichten. Circa 22% van het proefdiergebruik vond plaats in het kader van wettelijke bepalingen. Dit geldt ondermeer voor de registratie van nieuwe geneesmiddelen of chemische stof of voor de vrijgifte van een geproduceerde partij vaccin. De problematiek bij dit wettelijk verplicht onderzoek is op een aantal terreinen anders dan bij het overige onderzoek en als gevolg daarvan kunnen zich ook ontwikkelingen en trends voordoen die zich onderscheiden van het overige onderzoek.

Ontwikkelingen en trends met betrekking tot dierproeven kunnen gerelateerd zijn aan opzet en uitvoering, aan nieuwe inzichten in onderzoeksstrategieën of aan maatschappelijke en wetenschappelijke factoren die onderzoek initiëren. Het effect hiervan kan een afname in het proefdiergebruik zijn of juist een toename. Paradoxaal gezien kan een toename ook aan de basis liggen van een afname. Veelal gaat het hierbij om onderzoek als 'investering in de toekomst'. Ook kunnen zich parallelle ontwikkelingen en trends (zowel maatschappelijke en wetenschappelijk) voordoen die tegengesteld zijn in effect. In de volgende paragrafen zal een overzicht worden gegeven van de belangrijkste ontwikkelingen en trends.

### 4.2 Trends die een toename in het aantal dierproeven (kunnen) bewerkstelligen

Een toename in het aantal dierproeven kan diverse oorzaken hebben variërend van een nieuwe ontwikkeling in een wetenschappelijke discipline, zoals bijvoorbeeld de nanotechnologie, de uitvoering van beleidsbeslissingen zoals REACH of een versterking van een maatschappelijke prioriteit zoals een verminderde risico-acceptatie. In de volgende secties zullen een aantal van deze ontwikkelingen worden besproken.

### 4.2.1 REACH

Een voorbeeld van een parallelle ontwikkeling zoals boven genoemd is REACH. Door geïnterviewden wordt deze Europese verordening (nr. 1907/2006) inzake de Registratie, Evaluatie en Autorisatie van Chemische stoffen (REACH) vaak genoemd als beleidsontwikkeling die zowel grote impact zal hebben op het toxicologisch onderzoek, op het gebruik van proefdieren voor dit doel en op de ontwikkeling van 3V methoden. De kern van REACH is dat een bedrijf in principe van alle stoffen die het produceert, verwerkt of doorgeeft aan afnemers de risico's moet kennen en maatregelen moet benoemen (en voor het eigen bedrijf ook moet nemen) om die risico's te beheersen. Met de invoering van REACH verschuift de verantwoordelijkheid voor een adequate risicobeheersing van chemische stoffen naar het bedrijfsleven<sup>44</sup>. Van stoffen, zeker die voor 1 juli 1981 op de markt zijn gekomen, ontbreken veelal gegevens die een goede risicobeoordeling van deze stoffen mogelijk maken. REACH is er op gericht in een periode van 11 jaar ook voor deze stoffen een risicoprofiel op te stellen. De uitgebreidheid van het testpakket voor het opstellen van het risicoprofiel is gerelateerd aan de jaarlijkse productieomvang van de stof en/of aan het risicoprofiel van de stof. Het aantal stoffen waarvan het testpakket dierstudies kan bevatten wordt geschat op 30.000. Schattingen voor wat betreft het additionele proefdiergebruik komen uit op circa 9 miljoen en de totale kosten op 1.3 miljard EURO<sup>45</sup>. Medio 2009 is discussie ontstaan over aantallen stoffen, dierstudies en kosten. Nieuwe schattingen<sup>46</sup> kwamen uit op 67.000 stoffen, 54 miljoen dieren en 9.5 miljard EURO. Deze nieuwe cijfers zijn met kracht tegengesproken door de European Chemicals Agency<sup>47</sup> (ECHA, 2009), het instituut van de Europese Commissie dat verantwoordelijk is de beoordeling en administratieve afhandeling van registratieprocedures. Hoe het ook zij, uitvoering van REACH zal tot een toename in proefdiergebruik leiden. Als eerste zullen stoffen van het hoogste productie tonnage getest worden alsmede de stoffen die tot de groep van potentieel carcinogene of mutagene verbindingen gerekend kunnen worden of die mogelijke schade aanricht aan de voortplanting zogenaamde CMR stoffen). In het bijzonder deze categorie zal tot een significante stijging in het proefdiergebruik leiden, waarbij het zwaartepunt in aantallen dieren bij het reproductieonderzoek komt te liggen, in het bijzonder bij de twee-generatiestudie (zie ook bijlage 5).

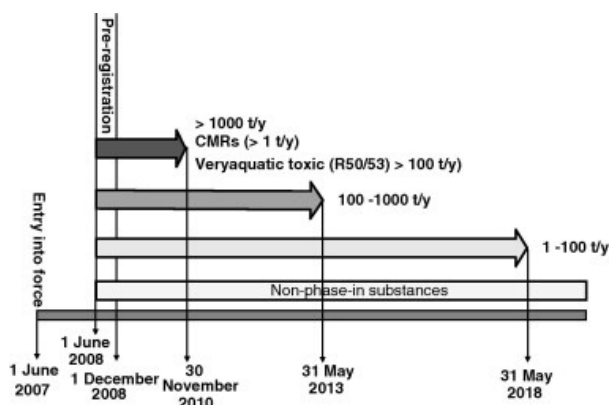
---

<sup>44</sup> <http://www.vrom.nl>

<sup>45</sup> Pedersen, F. et al. Assessment of additional testing needs under REACH. European Commission, Joint Research Centre, (2003) Report EUR 20863 EN.

<sup>46</sup> Hartung T. & Rovida C. Chemical regulators have overreached. *Nature* Vol.460, 27 August 2009, pp. 1080-1081.

<sup>47</sup> ECHA (2009). New study inaccurate on the number of test animals for REACH. ECHA/PR/09/11. <http://echa.europa.eu>



Figuur 4.1: geeft de tijdslijn voor REACH weer met daarbij prioriteit voor stoffen geproduceerd in een omvang van >1000ton/jaar en voor potentiële CMR stoffen<sup>48</sup>

Hoewel alle geïnterviewden aangeven dat REACH zal leiden tot een verhoging in het proefdiergebruik, wordt door sommigen van hen REACH ook gezien als beleid dat op termijn grote invloed kan hebben op een belangrijke plaats van 3V alternatieven in de regulatorische risico beoordeling van stoffen. Indirect heeft REACH geleid tot een substantiële aandacht binnen het 6e en 7e Kaderprogramma (FP6 en FP7)<sup>49</sup> van de Europese Commissie met onder andere 3V projecten op het gebied van reproductie toxiciteit (ReProTect), acute toxiciteit (ACuteTox), sensibilisatie (Sens-it-iv), *in vitro* carcinogeniteit (CarcinoGENOMICS), chronische toxiciteit (Predictomics) en toxicodynamiek en biokinetiek (PREDICT-IV).

In hoofdstuk 7.3 zal aanvullende informatie worden gegeven over REACH en de invloed op de ontwikkeling van 3V alternatieven

#### 4.2.2 Nanomaterialen

Onder nanotechnologie wordt de technologie verstaan die gericht op individuele structuren met een omvang tussen 1 nanometer en 100 nanometer. Op dit niveau kunnen grotere complex-functionele structuren met een fundamenteel nieuwe moleculaire organisatie gemaakt worden. Dit biedt de mogelijkheid tot de ontwikkeling van nieuwe materialen en systemen waarvan de componenten en structuren nieuwe, fysische, chemische en biologische eigenschappen en processen vertonen<sup>50</sup>. De belangstelling voor toepassing van nanotechnologie is dan ook groot. Door de overheid is in het kader van de Nederlandse kenniseconomie een bedrag van 235 miljoen Euro gereserveerd voor de ontwikkeling van nanotechnologie. Nano-producten worden inmiddels in diverse producten toegepast zoals als materiaal versterkers in autobanden of als UV-reflectoren in zonnebrandcrème. Op medisch gebied vindt nanotechnologie onder andere toepassing bij de ontwikkeling van implantaten of de ontwikkeling van steeds kleinere pace-makers. Maar het medisch toepassingsgebied is veel ruimer en lijkt het een panacee voor veel aandoeningen<sup>51</sup>, zowel op het gebied van diagnostiek, therapie en preventie. Gewerkt wordt aan antistoffen ('nanobodies') op basis van nanotechnologie, als carriers voor geneesmiddelen, het verlengen van de levensduur van cellen door anti-oxidante nanodeeltjes, als 'antibioticum' bij

<sup>48</sup> Schaafsma G., Kroese E.D., Tieleman E., Van de Sandt J.J.M., Van Leeuwen C.J., REACH, non-testing approaches and the urgent need for a change in mind set *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 53, 1: 70-80

<sup>49</sup> European Commission, Directorate General for Research (2009). Alternative Testing Strategies. Progress Report 2009. EUR23886.

<sup>50</sup> KNAW (2004). Hoe groot kan klein zijn. [http://www.know.nl/nieuws/pers\\_pdf/43732a.pdf](http://www.know.nl/nieuws/pers_pdf/43732a.pdf)

<sup>51</sup> Roszek B, Jong WH de, Geertsma RE. (2005). Nanotechnologie in medische toepassingen. Stand der wetenschap in materialen en producten. RIVM rapport 265001001.

bacteriële infecties<sup>52</sup>, maar ook bij het vervaardigen van bot vervangingsmateriaal of de productie van micro-naaldjes. In de toekomst ligt het belang van de technologieën vooral in de ontwikkeling van 'intelligente' apparaten die anticiperen op behoeften van mensen. De verwachting is dat de wereldwijde verkoop van nano-producten groeit van 25 miljard euro in 2004 tot 2600 miljard euro in 2010<sup>53,54</sup>.

Verwachtingen zijn er zeker met betrekking tot het gebruik van nanotechnologie in de ontwikkeling van 3V alternatieven. Zo kan het bijdragen aan de optimaliseren en gevoeliger maken van bio-sensoren, de ontwikkeling van en miniaturisatie van high-throughput bioreactor systemen ('lab-on-a-chip') voor de screening van stoffen<sup>55</sup> in het kader van toxicologisch onderzoek en lead-targeted screening in de geneesmiddelen ontwikkeling. De mogelijkheden voor toepassing binnen het 3V onderzoek lijken onbeperkt maar moeten zich nog wel bewijzen<sup>56</sup>.

Naast het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van 3V methoden, kan nanotechnologie ook van invloed zijn op een toename in het proefdiergebruik en is er maatschappelijke aandacht<sup>57</sup> voor de consequenties hiervan. Een mogelijke toename heeft alles te maken met onbekendheid voor wat betreft de mogelijke schadelijke effecten van nanodeeltjes<sup>58</sup> voor mens en milieu. Toxiche effecten van nanodeeltjes zijn beschreven. Voor wat het achterliggende mechanisme betreft wordt toxiciteit vaak in verband gebracht met asbest<sup>59</sup>. Evenals bij asbest is het bij nanodeeltjes niet de chemische structuur die bepalend is voor de toxiciteit maar de fysische eigenschappen als deeltjesgrootte, het oppervlak van de deeltjes<sup>60</sup> en het vormen van aggregaties<sup>61</sup>. Door de beperkte grootte kunnen nanodeeltjes natuurlijke barrières in het lichaam omzeilen zoals de bloedhersenbarrière of de huid, opgenomen worden in de cel en vervolgens door hun beperkte grootte schade aanrichten aan cellulaire structuren. Dit maakt de problematiek van nanodeeltjes in het kader van de risicobeoordeling van stoffen moeilijk en anders dan die van chemische stoffen. Het gaat nu niet om de concentratie van de stof maar om de vorm, de lengte en het oppervlak

Over de problematiek van de veiligheid zegt het KNAW rapport 'Hoe groot kan klein zijn' (2004): *'Voor een goede regelgeving met betrekking tot de maatschappelijke introductie van nieuwe nanodeeltjes is aanvullende regelgeving geboden in de vorm van amvb's. Dit vergt dat meer onderzoek wordt uitgevoerd naar mogelijke toxische eigenschappen van nanodeeltjes en hun kinetiek in organismen en het milieu. Mogelijk moeten nieuwe toxiciteitmodellen worden ontwikkeld.'*

De laatste jaren is er een toenemende belangstelling voor de toxiciteit van nanodeeltjes. Het invoeren van de zoekterm 'Nanoparticles and toxicity' in PubMed geeft een totaal van 1736 hits waarvan er alleen al 450 uit 2009 stammen (tot 1 december 2009). Uitbreiding van de zoekterm met 'in vivo' leverde voor 2009 circa 150 hits op en met 'in vitro' een vergelijkbaar aantal, wat . Algemeen echter wordt erkend dat nog weinig zekerheid bestaat over de risico's

---

<sup>52</sup> <http://www.kennislink.nl/publicaties/nano-deeltjes-bestrijden-hersenontsteking-en-meer>

<sup>53</sup> <http://www.rathenau.nl/showpage.asp?stelID=1&item=2726>

<sup>54</sup> <http://www.fd.nl/artikel/10113431/toepassingen-nanotechnologie-breken-binnen-tien-jaar-definitief>

<sup>55</sup> Van Midwoud PM, Groothuis GM, Merema MT, Verpoorte E (2010). Microfluidic biochip for the perfusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies. *Biotechnol Bioeng* 105(1): 184-194.

<sup>56</sup> Sauer UG. (2009). Animal and non-animal experiments in nanotechnology - the results of a critical literature survey. *ALTEX* 26(2): 109-128.

<sup>57</sup> [www.proefdiervrj.nl/nanotechnologie](http://www.proefdiervrj.nl/nanotechnologie)

<sup>58</sup> Jong WH de, Roszek B, Geertsma RE. (2005). Nanotechnologie in medische toepassingen. Mogelijke gezondheidsrisico's. RIVM rapport 265001002.

<sup>59</sup> <http://www.blikopnieuws.nl/bericht/83503>

<sup>60</sup> Pan Y, Neuss S, Leifert A et al. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3: 1941-1949.

<sup>61</sup> Höhr D, Steinfartz Y, Schins R et al. (2002). The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after installation of fine and ultrafine TiO<sub>2</sub> in the rat. *Int.J.Hyg. Environ. Health* 205 (3): 239-244.

van nanodeeltjes<sup>62</sup> en meer informatie nodig is over mate van blootstelling, kinetiek van de deeltjes in het lichaam en cytotoxiciteit. Om die reden valt er momenteel nog weinig te zeggen over aanvullende regelgeving voor wat betreft het onderzoek op veiligheid. Wel verdient het aanbeveling om juist nu te investeren in de ontwikkeling van 3V alternatieven. Immers, uit efficiëntie oogpunt aan het begin van het regelgevingstraject is het zinvoller direct met een 3V methode te kunnen beginnen dan later het wettelijk verplichte diermodel te vervangen door een 3V alternatief. Dit laat onverlet dat de komende jaren ook het onderzoek naar risico's van nanodeeltjes in dierexperimenteel onderzoek zal doorgaan, en dat dit onvermijdelijk tot additioneel proefdiergebruik zal leiden.

#### 4.2.3 Ziekten bij de mens en dier en life-style ziekten

Verdieping en diversificatie kenmerkt het onderzoek naar ziekten bij mens en dier. In dit verband wordt onder diversificatie verstaan de gerichte aandacht naar specifieke vormen van een ziekte of gevoeligheid bij specifieke groepen. Dit geldt onder andere voor het kanker onderzoek. Bij genoemd onderzoek doet zich ook een andere verschuiving plaats. Meer en meer worden bepaalde vormen van kanker een chronische aandoening. Dit stelt bijzondere eisen aan de gebuikte medicijnen en worden aspecten als chronische toxiciteit of carcinogeniteit belangrijker met als uitvloeisel een toenemende aandacht in de toelatingsprocedures en een toenemend gebruik aan proefdieren.

Aanzienlijk grotere effecten op het proefdiergebruik zijn te verwachten van verschuivingen in aandachtgebieden van onderzoek. Door geïnterviewden worden enkele gebieden met name genoemd: infectieziekten, life style gerelateerde ziekten en verouderingsziekten.

Infectieziekten vormen een van de belangrijke thema's in onze gezondheidszorg. Per jaar komen er 5 miljoen nieuwe AIDS patiënten bij, sterven er 2 tot 3 miljoen mensen aan tuberculose en circa 1,5 miljoen aan malaria. Van alle bedreigende ziekten in de wereld berust de meerderheid op een zoönose. Een recent voorbeeld zijn de pandemieën van de influenza varianten zoals H5N1 (vogelgriep) en H1N1 (Mexicaanse griep). Er zijn redenen om te veronderstellen dat bedreigende infectieziekten in de toekomst vaker zullen voorkomen alsmede het feit dat deze ziekten vaker een pandemische karakter zullen hebben:

- de groei van de wereldbevolking. Deze groei heeft twee consequenties: de noodzaak tot intensivering en schaalvergroting van de voedselproductie en een toename van de infectiedruk, door "crowding", zowel voor mens en dier.
- Ecologische veranderingen; klimaatveranderingen waardoor exotische ziekten bedreigingen worden in de westerse landen (bv. Dengue, malaria, Q-koorts). Daarbij komt dat uitwisseling met gebieden waarin deze pathogenen inheems zijn geïntensiveerd is door toenemende handel en toerisme.

Naast genoemde redenen kan, in relatie tot pathogene bacteriën ook de toenemende resistentie voor antibiotica genoemd worden. Additioneel dierexperimenteel onderzoek zal vooral gericht zijn op fundamentele vragen als karakterisatie van het pathogene micro-organismen en pathogenese en op de ontwikkeling van een effectieve therapie of zo mogelijk vaccin. Een daaraan gerelateerde ontwikkeling is het opzetten van surveillance studies in wilde en gedomesticeerde dieren om de verspreiding van het micro-organisme te monitoren<sup>63</sup>.

Een in belang toenemende groep aandoeningen is de categorie van zogenaamde 'life-style' gerelateerde ziekten. Voor life-style gerelateerde ziekten bestaan verschillende

---

<sup>62</sup> [http://www.rivm.nl/rvs/075\\_nanotechnologie/vragen/#tcm:35-52838](http://www.rivm.nl/rvs/075_nanotechnologie/vragen/#tcm:35-52838)

<sup>63</sup> <http://www.oneworldonehealth.org/>

omschrijvingen. Zo ziet de WHO life style gerelateerde ziekten als een term die wordt gebruikt wanneer men de nadruk wil leggen op gedrag bij chronische ziekten<sup>64</sup>. In dit rapport zal de omschrijving worden gebruikt uit Wikipedia:

*“Lifestyle diseases (also sometimes called diseases of longevity or diseases of civilization interchangeably) are diseases that appear to increase in frequency as countries become more industrialized and people live longer”.*

Tot de life-style gerelateerde ziekten behoort een breed scala van aandoeningen als neurodegeneratieve ziekten (bijvoorbeeld Multiple Sclerose en de ziekte van Parkinson), geestesziekten (bijvoorbeeld depressiviteit), verouderingsziekten (bijvoorbeeld Alzheimer, atherosclerose, kanker en osteoporose), voedingsgerelateerde ziekten (bijvoorbeeld Type 2 diabetes en obesitas), maar ook astma, chronische leverziekten, COPD, chronisch nierfalen en hart- en vaatziektenziekten,

Het gaat buiten de kaders van dit rapport om elke ziekte afzonderlijk te behandelen. Nadere informatie over specifieke ziekten wordt gegeven in Hoofdstuk 7 (Toepassingsgebieden van dierexperimenteel onderzoek). Duidelijk is dat de incidentie van deze aandoeningen sterk toeneemt (zie kader voor Type 2 suikerziekte). Als gevolg hiervan groeit de behoefte aan gericht onderzoek. Deels is dit onderzoek op proefdiergebruik gebaseerd, waarbij het gebruik van GM modellen in toenemende mate centraal staat. Zo bestaan er transgene lijnen die een versneld verouderingsproces laten zien of modellen die specifiek voor het onderzoek naar suikerziekte (diabetes) worden gefokt.

Type 2 of insuline-onafhankelijke diabetes maakt 90% van alle gevallen van suikerziekte uit. In de USA stond diabetes op de 6<sup>e</sup> plaats van de doodsoorzaken<sup>65</sup>. Hoewel de kennis over diabetes de laatste jaren is toegenomen, is nog veel onduidelijk, zowel voor Type 1 als Type 2 diabetes. Belangrijke aandachtsgebieden in het diabetes onderzoek zijn de etiologie en pathogenese (wat is de genetische basis van diabetes, wat is het mechanisme achter virale en toxische triggers), mogelijke interventiestrategieën en de pathofysiologie en behandeling van mogelijke complicaties zoals nephropathy en neuropathy. Diermodellen spelen binnen alle vraagstellingen een belangrijke rol<sup>66</sup>, met een duidelijke focus op spontane ziektemodellen, geïnduceerde modellen en transgene diermodellen. In deze context kan niet onvermeld blijven dat ook het gebruik van weefselkweek methoden in belang toeneemt, in het bijzonder het gebruik van stamcellen die tot insuline producerende cellen differentiëren<sup>67</sup>.

In toenemende mate worden voor het onderzoek vervangingsalternatieven gebruikt, in het bijzonder weefselkweek methoden, soms op basis van materiaal verkregen van humane donoren. Veelal worden deze weefselkweek methoden gebruikt voor fundamentele onderzoeksvragen gericht op specifieke aspecten van de ziekte of op achterliggende mechanismen rondom de veroudering van de cel. Bestudering van complexe ziekte gerichte vraagstellingen vindt echter noodzakelijkerwijs plaats in diermodellen, bij voorkeur in knaagdieren (zoals genetisch gemodificeerde dieren), maar ook in grotere diersoorten als primaten. Zo vinden er in het kader van onderzoek naar neurodegeneratieve aandoeningen studies plaats in de resus apen en de marmoset.

---

<sup>64</sup> World Health Organization: Preventing Chronic Diseases: A lifetime investment: WHO Global report, 2005

<sup>65</sup> King H., Aubert R.E. & Herman W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1212-1231

<sup>66</sup> Tirabassi R.S., Flanagan J.F., Wu T., Kislauskis E.H., Birckbichler P.J. & Guberski D.L. (2004). The BBZDR/Wor rat model for investigating the complications of Type 2 diabetes mellitus. *ILAR Journal* 45(3): 292-302.

<sup>67</sup> Peck A.B., Yin L. & Ramiya V. (2004). Animal models to study adult stem cell-derived, in vitro-generated islet implantation. *ILAR Journal* 45(3): 259-267.

#### 4.2.4 Risico acceptatie

Aan een substantieel deel van het proefdiergebruik ligt het voorkomen van risico's ten grondslag. Geneesmiddelen, vaccins, chemische stoffen kunnen alleen op de markt gebracht worden als er een beoordeling heeft plaatsgevonden van de mogelijke risico's bij blootstelling, de zogenaamde risk assessment. Aan risico minimalisatie liggen veelal wettelijke regelingen ten grondslag, in toenemende mate opgesteld in een internationaal kader zoals door OECD (chemische stoffen), EMEA (geneesmiddelen) of de Europese Farmacopee en EMEA (geneesmiddelen, vaccins).

Risico acceptatie wordt in sterke mate ingekleurd door de perceptie van beheersbaarheid. Voor activiteiten of handelingen waarover een gevoel van eigen beheersbaarheid bestaat, zoals het rijden in een auto of het uitoefenen van extreme sporten, is men geneigd zekere risico's te aanvaarden. Bij zaken echter waarbij eigen beheersbaarheid afwezig is, staat men veelal kritischer ten aanzien van aanvaardbare risico's.

In 1955 vond het Cutter incident plaats. Cutter verwijst naar de naam van de Amerikaanse vaccinproducent die een geïnactiveerd poliomyelitis (Salk) vaccin op de markt bracht. Het incident bestond eruit dat een partij vaccin op de markt werd gebracht dat onvoldoende was geïnactiveerd en daarom nog levende virusdeeltjes bevatte. Als gevolg daarvan liepen 56 gevaccineerde kinderen verlamningsverschijnselen op en stierven er 5<sup>68</sup>. Dit incident heeft mede geleid tot de introductie van de neurovirulentie test in routine controle van geproduceerde batches polio vaccin (tegenwoordig alleen voor het levende (Sabin) polio vaccin) in primaten. Ramingen laten zien dat deze test jaarlijks wereldwijd 4000 tot 5000 primaten vereist<sup>69</sup>.

Het Softenon drama deed zich voor in 1957. Softenon verwijst naar het slaapmiddel Thalidomide, geproduceerd door een Duitse fabrikant dat in dat jaar op de markt kwam. Gebruik van het middel door zwangere vrouwen in het eerste stadium van de zwangerschap leidde in veel gevallen tot ernstige misvormingen van de vrucht, vooral van de extremiteiten. Toen het middel in 1961 uit de handel werd gehaald waren al circa 10.000 Softenon kinderen geboren<sup>70</sup>. Het Softenon drama heeft geresulteerd in de introductie van de teratogeniciteitstest in het veiligheidsonderzoek van chemische stoffen en geneesmiddelen en is mede aanleiding geweest om in Nederland een toelatingsbeleid voor nieuwe geneesmiddelen te introduceren en het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) in te stellen<sup>71</sup>.

Het geneesmiddel TGN1412 was een mAb die ontwikkeld was in Duitsland om in patiënten met chronische leukemie een antitumor T-cell respons op te wekken. Een tweede toepassingsgebied was reumatoïde artritis. De monocloonaal was voorheen uitvoerig op veiligheid getest in het pre-klinisch onderzoek, inclusief in een aantal diermodellen waaronder de primate. Bij het inzetten in Fase 1 van de klinische evaluatie ontstonden grote problemen in de vorm van een overgevoeligheidsreactie en orgaanfalen<sup>72</sup>. De problemen hebben aanleiding gegeven tot het verder aanscherpen van het veiligheidsonderzoek van mAbs met een beoogde klinische toepassing en tot een verfijning in de dosis selectie voor de klinische studie<sup>73</sup>.

Het vergroten van veiligheid en derhalve het verkleinen van risico's is een belangrijke factor geweest in de toename van het aantal dierproeven. Incidenten in

---

<sup>68</sup> Martin M. (1981). The price of polio vaccine. *Lab.Anim.* 10 (1): 20-25.

<sup>69</sup> Pieters F. (2007). Non-human primates in biomedical research. <http://www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel/content/publicaties/pub-dierenwelz.html>

<sup>70</sup> Reith J.F. (1962). History of the Softenon drama. *Pharm.Weekbl.* 97: 972-976.

<sup>71</sup> [http://www.rivm.nl/vtv/object\\_document/o8189n20626.html](http://www.rivm.nl/vtv/object_document/o8189n20626.html)

<sup>72</sup> Sunaralingam G. et al. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N.Engl.J.Med.* 355: 1018-1028.

<sup>73</sup> Muller P.Y. and Brennan F.R. (2009). Safety assessment and dose selection for First-in-Human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 85(3): 247-258

het verleden hebben geleid tot de introductie van nieuwe veiligheidstesten. Sprekende voorbeelden uit de geschiedenis hiervan zijn het Cutter incident in 1955, het Softenon drama uit 1957 en de problemen in 2006 in de klinische studie met de monoclonaal (mAb) TGN1412.

Bij geïnterviewden bestaat de indruk dat de risico acceptatie in de maatschappij met betrekking tot de veiligheid van stoffen afneemt. Een actueel onderwerp is de recente maatschappelijke discussie over mogelijke bijwerkingen van het H1N1 influenza (Mexicaanse griep) vaccin. Een deel van de discussie draait om de toevoeging aan het vaccin van het kwikhoudende conserveringsmiddel Thiomersal. Vanaf 1940 wordt thiomersal toegevoegd aan vaccins (N.B. voor de vaccins in het Rijksvaccinatieprogramma wordt dit middel niet meer gebruikt). Wetenschappelijk onderzoek, veelal in dierstudies uitgevoerd, heeft laten zien dat bij de geringe dosis die wordt gebruikt, geen bijwerkingen te verwachten zijn<sup>74</sup>. Een ander voorbeeld van verminderde risico acceptatie is de lobby die onder andere door milieuorganisaties is gevoerd om via de REACH wetgeving additionele informatie beschikbaar te krijgen over de effecten van veel meer chemische stoffen op mens en milieu dan thans het geval is<sup>75</sup>. Het is zeer aannemelijk dat informatie over meer stoffen impliciet betekent dat er meer dierexperimenteel onderzoek nodig zal zijn. Andere voorbeelden van een verminderde risico acceptatie in relatie tot additioneel veiligheidsonderzoek is de maatschappelijke aandacht voor hormoonverstorende stoffen en voor GMOs in de voeding.

De vraag mag gesteld worden hoe realistisch het streven naar absolute veiligheid is. Het antwoord is duidelijk. Noch onderzoek in proefdieren, noch in *in vitro* modellen en, mocht dit al mogelijk zijn, in de mens zelf zal in absolute zin zekerheid kunnen geven over de veiligheid van stoffen. Elke uitspraak over de resultaten van onderzoek kent een aantal aannames en onzekerheden. Zo is veelal weinig bekend over de dosis waaraan de mens wordt blootgesteld (geneesmiddelen en enkele andere producten uitgezonderd) en verschillen blootstellingsduur, metabolisme en veel andere factoren tussen het onderzoekssubject en de mens. Risico beoordeling vereist een extrapolatiestap en een generalisatie van die extrapolatie naar de populatie. Dat impliceert dat men te maken heeft met onzekerheden zoals extrapolatie, blootstellingskarakteristieken, interindividuele gevoeligheid en andere zaken. Binnen dit complex van onzekerheden speelt de factor 'aantal dieren' dat wordt gebruikt een ondergeschikte rol. Met andere woorden, het toevoegen van meer dieren aan de test verhoogt de precisie van de risico beoordeling maar in zeer beperkte mate. Wel zijn er mogelijkheden om via een probabilistische \*benadering de mate van onzekerheid in de risico beoordeling aan te geven<sup>76</sup>. Daarnaast wordt gewerkt aan het verkleinen van de onzekerheidsfactor. Een belangrijk hulpmiddel daarbij is het verkrijgen van inzicht in het werkingsmechanisme van de stof, het geneesmiddel of het vaccin. Onderzoek hiernaar is een belangrijk element geworden in het opbouwen van een dossier voor de registratie van de stof. Vooruitgang zal de komende jaren geboekt worden dankzij het beschikbaar komen van nieuwe onderzoeksmodellen. Het kan hierbij gaan om nieuwe transgene diermodellen die opheldering geven over specifieke (patho)fysiologische processen, maar ook om *in vitro* methoden als weefselweek en tissue engineering, *in silico* modelleringen als PBBK en om moleculair biologische technieken als bioinformatica en systems biology. Echter gerealiseerd moet worden dat vanwege de diversiteit in menselijke

---

<sup>74</sup> [http://www.rivm.nl/cib/binaries/Thiomersal%20in%20vaccins\\_tcm92-63606.pdf](http://www.rivm.nl/cib/binaries/Thiomersal%20in%20vaccins_tcm92-63606.pdf)

<sup>75</sup> <http://www.greenpeace.nl/press/releases/greenpeace-reach-amsterdam>

\* Probabilisme is de leer der waarschijnlijkheid (bron: wikipedia)

<sup>76</sup> Bos P.M., Boon P.E., Voet H.V. et al. (2009). A semi-quantitative model for risk appreciation and risk weighing. *Food Chem. Toxicol.* 47(12):2941-2950

fenotypen meer dan een generaliserend antwoord over veiligheid niet mogelijk is en ook in de toekomst een zeker risico aanwezig blijft voor individuen of categorieën individuen.

### 4.2.5 Translationeel onderzoek

Doel van het translationeel onderzoek is om veelbelovende ontwikkelingen in het laboratorium 'te vertalen' naar toepassingen in de kliniek. Maar ook de omgekeerde weg is belangrijk: het 'vertalen' van bevindingen uit de kliniek naar gerichte onderzoeksvragen in het laboratorium. Door geïnterviewden wordt translationeel onderzoek als een belangrijke nieuwe stap gezien in de interactie tussen preklinisch en klinisch onderzoek. Dit is in lijn met het advies dat in 2007 is gegeven door de Raad voor gezondheidsonderzoek OCW en VWS om een programma voor competitief translationeel onderzoek tot stand te brengen<sup>77</sup>. Uit dit advies is het ZonMw Programma Translationeel Onderzoek voortgekomen. Daarnaast is het mede de aanleiding geweest om in 2006 TI-Pharma op te zetten en het Center for Translational Molecular Medicine (CTMM); beide berustend op een samenwerkingsverband tussen industriële en universitaire onderzoeksteams in innovatief geneesmiddelenonderzoek.

Met betrekking tot het onderwerp van deze trendanalyse biedt translationeel onderzoek verschillende aanknopingspunten. Allereerst mag verwacht worden dat translationeel onderzoek tot nieuwe onderzoeksvragen zal leiden, vaak toegepast en oplossingsgericht. *In vitro* modellen zullen niet altijd relevant zijn voor deze vraagstellingen en additioneel dierexperimenteel onderzoek noodzakelijk maken. Mogelijk geldt dit in versterkte mate voor vragen die vanuit de kliniek naar het laboratorium gaan. Aan de andere kant echter kan de relatie tussen fundamenteel en toegepast onderzoek ook een uitdaging betekenen omdat op een efficiënte manier innovatieve methoden vanuit het fundamenteel of funderend onderzoek beschikbaar kunnen worden gemaakt voor het toegepast onderzoek (denk aan beeldvormende technieken, bioinformatica).

## 4.3 Trends die een afname in het aantal dierproeven (kunnen) bewerkstelligen

Trends die tot een afname in het aantal dierproeven kunnen leiden zijn zeer divers en kunnen direct van aard zijn, dat wil zeggen dat de afname breikt kan worden door wijzigingen in de dierproef zelf of door indirect door veranderingen in de omstandigheden waaronder die dierproeven toepassing vinden. Voorbeelden van de eerste categorie zijn wijzigingen in de opzet van een dierproef of een kritische analyse van bestaande dierproeven. Voorbeelden van een indirecte afname zijn wijzigingen in test paradigma's.

### 4.3.1 Experimentele opzet en statistische analyse

Experimentele opzet en statistische analyse liggen aan de basis van een correcte interpretatie van onderzoeksresultaten. Het was de Franse onderzoeker Claude Bernard (1813-1878) die ons op dit terrein de weg gewezen heeft. Bernard introduceerde een rationele benadering van onderzoek doen<sup>78</sup> waarin aspecten als onderzoeksvraag, standaardisatie van experimentele condities, gebruik van controle groepen en statistiek centraal stonden.

---

<sup>77</sup> Raad voor Gezondheidsonderzoek (2007). Translationeel onderzoek in Nederland – Van Kennis naar Kliniek. Den Haag

<sup>78</sup> Bernard C. (1957). An introduction to the study of experimental medicine. Chapter III. Dover Publications, New York. (This is an English version of Bernard's work 'Introduction à l'étude de la médecine expérimentale' originally published in France in 1865)

Het gedachtegoed van Bernard is standaard geworden in het dierexperimenteel onderzoek en aspecten als proefopzet en statistiek zijn elementen van de cursus Proefdierkunde die voor proefdieronderzoekers in spe (art.9 Wod) verplicht is. Geïnterviewden constateren de laatste tijd een verhoogde belangstelling voor genoemde onderwerpen. Dit heeft 2 redenen: a) in de praktijk blijken aspecten als de opzet van de proef (experimental design) en statistische evaluatie nog al eens de zwakke schakel<sup>79,80</sup> in een proefopzet en b) het beschikbaar komen van nieuwe benaderingen in experimental design en statistiek.

Experimental design en statistische evaluatie, zeker in complexe onderzoeksopzetten of vraagstellingen, vereisen een expertise die vaak op een ander vlak ligt dan de expertise die de onderzoeker heeft in het kader van zijn onderzoeksterrein. Wanneer geen gebruik gemaakt wordt van specifieke kennis op genoemde gebieden is de kans aanwezig dat het onderzoek tot suboptimale resultaten zal leiden of er conclusies uit de resultaten getrokken worden die niet valide zijn. Dit kan consequenties hebben voor een verantwoord gebruik van proefdieren. In sommige landen worden (bio)statistici betrokken bij de toetsing door een dierexperimentencommissie. Het advies van (bio)statistici mee te nemen in de wetenschappelijke toetsing van een proefopzet zou een andere benadering kunnen zijn.

Experimental design en statistiek zijn levende wetenschappen die een bijdrage kunnen leveren aan een verdere optimalisatie van dierproeven. Optimalisatie kan zich vertalen in een efficiënter proefdiergebruik en uiteindelijk in een reductie in het aantal benodigde dieren. Een voorbeeld hiervan is de toenemende belangstelling voor de Benchmark dose (BMD) benadering in de risicobeoordeling van stoffen, waarbij gebruikt gemaakt wordt van een groter aantal doseringgroepen met een beperkt aantal dieren per groep<sup>81</sup>.

#### 4.3.2 Een kritische evaluatie van bestaande diermodellen

In toenemende mate worden diermodellen kritisch tegen het licht gehouden. Dit geldt vooral voor diermodellen uit het wettelijk verplicht onderzoek. De reden hiervoor is duidelijk. Het gaat hierbij om onderzoek dat een routinematig karakter en waarbij data bases aanwezig zijn van onderzoeksresultaten die een retrospectieve analyse mogelijk maken. Trendsettend op dit terrein is het onderzoek van Zbinden & Flury-Roversi<sup>82</sup> uit 1981 geweest naar de relevantie van de LD50 test voor de toxicologische evaluatie van chemische stoffen. Uiteindelijk heeft dit geleid tot en herwaardering van het belang van deze test en de ontwikkeling van alternatieve benaderingen.

Een kritische evaluatie kan tot verschillende uitkomsten leiden. Allereerst kan een retrospectieve analyse van testresultaten tot het inzicht leiden dat het diermodel een beperkte waarde heeft en onder voorwaarde weggelaten kan worden. Een dergelijke benadering heeft geleid tot het weglaten van 2 veiligheidstesten uit de kwaliteitscontrole vaccins: de abnormale toxiciteitstest<sup>83</sup> voor het

---

<sup>79</sup> Festing M.F.W., Altman DG. 2002. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *JLAR J* 43:244-258.

<sup>80</sup> Roberts I., Kwan I., Evans P., Haig S. 2002. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation. *Br Med J* 324:474-476.

<sup>81</sup> Slob W, Moerbeek M, Rauniomaa M, Piersma AH. (2005). A statistical evaluation of toxicity study designs for the estimation of the benchmark dose in continuous endpoints. *Toxicol.Sci.* 84(1): 167-185

<sup>82</sup> Zbinden G. and Fluri-Roversi M. (1981). Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch.Toxicol.* 47(2): 77-99.

<sup>83</sup> Cussler K. (1999). A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. *Dev.Biol.Stand.* 101: 121-126.

veiligheidsonderzoek van humane vaccins en de Target Animal Safety test<sup>84</sup> voor het veiligheidsonderzoek van veterinaire vaccins. Binnen het toxicologisch onderzoek en het farmacologisch onderzoek staat vooral het gebruik van een 2e diersoort in de belangstelling<sup>85</sup>. Voor REACH spitst de discussie zich momenteel toe op het gebruik van de 2e generatie in de twee-generatie studie in de ontwikkelingstoxicologie<sup>86</sup>. Indien het mogelijk zal zijn op basis van extra parameters in een één-generatie studie voldoende informatie te genereren over mogelijke toxiciteit voor nakomelingen kan het aantal proefdieren welke voor het REACH programma nodig zijn, aanzienlijk worden gereduceerd. Een kritische analyse van de relevantie van een diermodel kan ook plaatsvinden op basis van een meta-analyse van bestaande literatuur<sup>87</sup>. Uitgangspunt hierbij is dat de analyse onbevooroordeeld moet zijn en niet gestuurd wordt door een gewenste uitkomst. Vooral evaluaties van maatschappelijk gevoelig onderzoek lijden nog wel eens aan een gebrek aan objectiviteit, en zowel voor- als tegenstanders van dit onderzoek kunnen zich hier schuldig aan maken.

Een andere benadering met betrekking tot een kritische analyse is de systematische analyse<sup>88</sup> van een diermodel op de mogelijkheden van 3Vs. Deze benadering kan leiden tot het uiteindelijk 'strippen' van het diermodel tot de essentie van de informatie die nodig is om de onderzoeks/test vraag te beantwoorden. Hierbij wordt onder 'stippen' verstaan het ontdoen van diermodel van niet procedures, parameters, controle groepen die niet relevant zijn voor de beantwoording van de onderzoeksvraag en/of het aantal dieren in overeenstemming brengen met het statistisch noodzakelijke aantal.

#### 4.3.3 Wijzigingen in de onderzoeksstrategie en test paradigma.

Van fundamentele aard zijn ontwikkelingen die leiden tot een paradigma verandering in de onderzoek/test vraag. Dergelijke veranderingen kunnen een grote invloed hebben op het aantal en opzet van dierproeven binnen een onderzoekdiscipline, veelal, maar niet altijd, leidend tot een afname in het proefdiergebruik. Paradigma veranderingen vereisen een wijziging in de traditionele manier van onderzoek doen en vergen om die reden veel tijd. In het navolgende zal een overzicht worden gegeven van de ontwikkelingen die zich momenteel op dit terrein voordoen en waarvan de komende jaren de haalbaarheid duidelijk zal worden. Het gaat daarbij om de consistency benadering in de vrijgifte controle van geproduceerde partijen vaccin, het translationeel onderzoek in de geneesmiddelen ontwikkeling en de Intelligent Testing Strategy in het toxiciteitsonderzoek en de risico beoordeling van stoffen.

#### De Intelligent Testing Strategy (ITS)

ITS, ook wel Integrated Testing strategy genoemd, neemt afstand van de klassieke benadering in de risico beoordeling van stoffen waarbij, ongeacht het type stof een vast protocol van testen wordt uitgevoerd. ITS is sterk gelieerd aan het programma REACH en beoogt op een zo efficiënt mogelijke manier en met een zo beperkt mogelijk gebruik van proefdieren voldoende informatie te verzamelen voor de

---

<sup>84</sup> AGAATI (2002). The Target Animal Safety Test – is it still relevant? *Biologicals* 30(4): 277-287.

<sup>85</sup> Janer G et al. (2008). A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50(2): 206-217

<sup>86</sup> Janer G. et al. (2007). A retrospective analysis of the two-generation study: what is the added value of the second generation? *Reprod. Toxicol.* 24(1): 97-102.

<sup>87</sup> Pieters F. (2007). Non-human primates in biomedical research.

<http://www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel/content/publicaties/pub-dierenwelz.html>

<sup>88</sup> Hendriksen CF. (2004). Reduction of numbers of animals used in the quality control of vaccines. *ATLA*, Suppl.2: 53-58.

veiligheidsevaluatie van de stoffen in REACH. De ITS gaat uit van het principe dat het testprotocol gerelateerd dient te zijn aan voorkennis over de stof en de beoogde toepassing van de stof<sup>89</sup>. Benaderingen die hierbij worden genoemd zijn:

- Threshold of Toxicological concern (TTC)<sup>90</sup>: dit paradigma gaat uit van een omkering in de risico beoordeling van stoffen. Uitgangspunt is het vaststellen van het niveau van blootstelling waarbij er geen gezondheidsrisico's verwacht worden. Verondersteld wordt dat op basis van de chemische structuur voor een stof en bij beschikbaarheid van stoffen met een vergelijkbare chemische structuur waarvan het toxicologisch profiel wel bekend is, er al een uitspraak kan worden gedaan over de risico's van de stof voor het niveau waaraan mensen redelijkerwijs kunnen worden blootgesteld.<sup>91</sup> Dierexperimenteel onderzoek zou dan niet meer noodzakelijk zijn.
- Data sharing: het uitwisselen van gegevens en ervaring relevant voor de risicobeoordeling door bedrijven die dezelfde stof op de markt brengen; Hoewel in uitvoering relatief simpel, kan data sharing bemoeilijkt worden door vragen over bijvoorbeeld intellectueel eigendom van de gegevens of kosten die door de uitvoerders van het onderzoek gemaakt zijn<sup>92</sup>.
- Read across: het clusteren van stoffen met vergelijkbare profielen voor wat betreft fysisch-chemische eigenschappen en het testen van representatieve stoffen uit iedere cluster in relevante dierstudies. Op basis van deze gegevens kan een 'vertaalslag' plaatsvinden naar de andere stoffen uit dezelfde cluster. Indeling van stoffen gebeurt onder andere op basis van computational technieken als Quantitatieve Structuur Activiteits Relaties (QSARs):.
- Tiered testing approaches: een stapsgewijze benadering en sturing in het onderzoek waarbij elke volgende studie gebaseerd is op gegevens van voorgaande testen (zie ook 7.3)
- Reverse risk assessment: de uitbreidbaarheid van het onderzoek wordt gebaseerd op de mate waarin de mens/dier of milieu aan de stof kan worden blootgesteld
- Human experience: in de opzet van de risicobeoordeling worden mogelijke gegevens uit epidemiologische studies betrokken;
- (Q)SARs: QSAR maakt gebruik van computermodellen die informatie over de chemische structuur van de stof koppelt aan mogelijk toxische eigenschappen. QSARs maken gebruik van data-bases waarin informatie over de relatie tussen structuur en activiteit voor een groot aantal stoffen is opgeslagen. Voor een stof met onbekende activiteit zoekt de QSAR in de data-base naar een match (zie ook 7.3)
- PBBK: PBBK (Physiological-based biokinetic modelling) berust op een mathematische modellering van farma(toxico)kinetiek van een stof in het lichaam met betrekking tot opname, distributie, metabolisering en excretie (ADME), dit door gegevens over anatomie, fysiologie en fysisch-chemische processen te integreren en te 'vertalen' naar een complex organisme (zie ook 7.3).

---

<sup>89</sup> Ahlers J., Stock F. and Werschkun B. (2008). Integrated testing and intelligent assessment-new challenges under REACH. *Environ.Sci.Polut.Res.Int.* 15(7): 565-572.

<sup>90</sup> Kroes R., Kleiner J., Renwick A. (2005). The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. *Toxicological Sciences* 86(2): 226-230.

<sup>91</sup> European Commission (2008). Draft OPINION ON Use of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) Approach for the Safety Assessment of Chemical Substances. SCCP/1171/08

<sup>92</sup> <http://forums.alttox.org/index.php?topic=401.0>

##### Risico beoordeling van stoffen

Traditioneel doorloopt de risico beoordeling van stoffen 4 stappen: Allereerst wordt vastgelegd wat de toxische eigenschappen zijn van een stof (hazard characterisation), dan wordt gekeken wat het verband is tussen blootstelling en toxisch effect (hazard assessment), vervolgens wordt de mate van blootstelling bekeken (risk characterisation) en tot slot worden de gezondheidsrisico's voor mens, dier of milieurisico's vastgelegd (risk assesment)<sup>93</sup>. Deze benadering wordt het toxicologische paradigma genoemd. Een belangrijk deel van de gegevens die nodig zijn voor de risico beoordeling worden verkregen uit diertesten waarvan de uitvoering veelal is vastgelegd in weinig flexibele procedures. Het afgelopen decennium is deze benadering ter discussie komen te staan, onder andere in het rapport 'Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering' van de Gezondheidsraad (2001)<sup>94</sup>. Centraal punt van kritiek is dat weliswaar informatie wordt verkregen over de effecten van een stof maar niet over het achterliggende werkingsmechanisme en over de wijze waarop en de mate waarin mens/dier of milieu (kunnen) worden blootgesteld. Daarbij worden in de dierstudies veelal stof doseringen gebruikt die niet realistisch zijn in relatie tot blootstelling bij de mens. Risico beoordeling gaat dan ook uit van extrapolaties en aannames in de vertaling van data uit dierstudies die controversieel kunnen zijn<sup>94</sup> omdat ze een onzekerheid inhouden zoals verschillen tussen proefdier en mens in blootstelling, metabolisme e.a.. Daarnaast is de huidige manier van risico beoordeling duur, tijdrovend en onder druk om dierethische redenen.

Uitgangspunt voor de paradigma verandering is de toenemende beschikbaarheid aan geavanceerde *in vitro* modellen, moleculair biologische technieken, computational software en systems biology.

In het ontrafelen van het werkingsmechanisme zijn er verschillende stappen die gezet kunnen worden. Het onderstaande geeft een beknopt overzicht.

- Het karakteriseren van de stof; dit voor wat betreft zijn fysisch-chemische eigenschappen (o.a. door middel van QSARs), mogelijke metabolieten en expositie scenario's. Computer modellen kunnen gebruikt worden om potentiële interacties van de stof of de afbraakproducten van de stof met de cel te voorspellen.
- Het in kaart brengen van toxicologische pathways; dat wil zeggen van de cellulaire processen die in werking worden gezet na interactie van de stof met de cel en het organisme. Voor bestudering van pathways kunnen relatief simpele high throughput systemen (HTS) worden gebruikt, zoals primaire cellen en visembryo's, met als eindpunten de binding van de stof aan cellulaire eiwitten, verandering van genexpressie profielen, effecten op celdifferentiatie of celdeling e.a.. Een voorbeeld van een dergelijk programma is ToxCast<sup>TM,95</sup> uitgevoerd door het National Center for Computational Toxicology (USA) waarbij 300 stoffen (vooral pesticiden) worden gescreend in HTS systemen op basis van meer dan 400 eindpunten. De resultaten van het HTS onderzoek worden gerelateerd aan de resultaten behaald met specifieke *in vitro* en *in vivo* toxiciteitstesten. De verwachting is dat naarmate er meer bekend wordt over toxicologische pathways, *in vitro* tests ontwikkeld kunnen worden die een steeds betere voorspellende waarde hebben voor de reacties in een heel organisme.

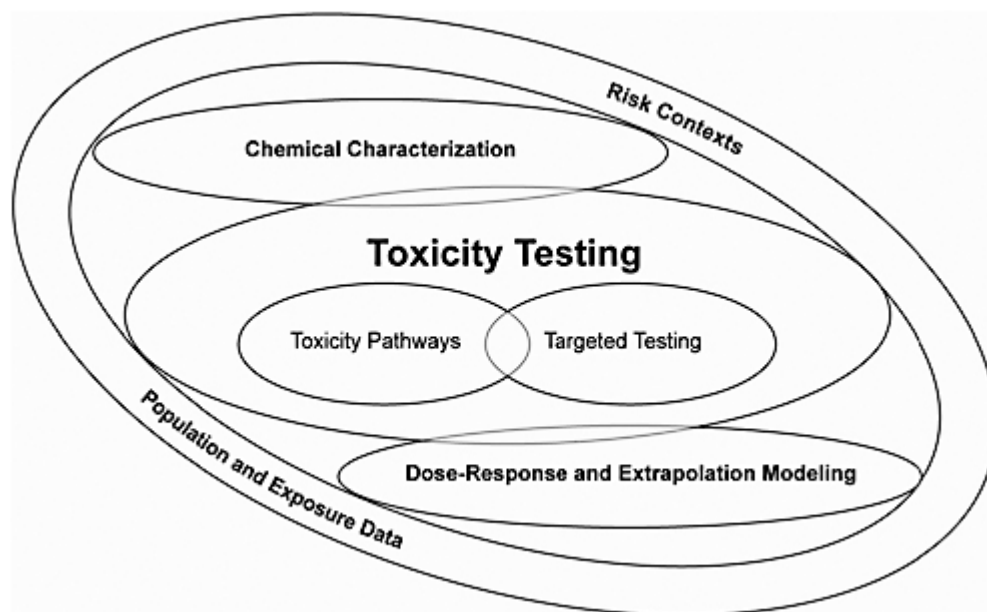
---

<sup>93</sup> Gezondheidsraad 2001: <http://www.gezondheidsraad.nl/nl/adviezen/onderzoek-gezondheidsrisicos-stoffen-een-gerichtere-benadering>

<sup>94</sup> NRC. (2007). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. The National Academies Press, Washington DC. ISBN 0-309-10992-2

<sup>95</sup> <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>

Belangrijke elementen in de paradigm shift zijn ook de aspecten dosis-respons modellering en blootstellingsscenario's. Voor de dosis-respons modellering zal informatie over celtoxiciteit en informatie over de ADME onontbeerlijk zijn. De bovengenoemde stappen verwacht men te kunnen relateren aan data van epidemiologische studies over de blootstelling van de menselijke populatie aan



Figuur 4.1: Afbeelding van de visie beschreven in het rapport "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy"<sup>96</sup>. Chemische karakterisering, testen van toxicologische pathways, modellering van de dosis respons relatie en extrapolatie worden gerelateerd aan epidemiologische gegevens en vormen hierbij de basis voor het beleidsvormende proces.

stoffen bijvoorbeeld door gegevens over stoffen gevonden in bloed, urine etc. Niet alleen zal dit tot betere inzichten in toxicologische pathways leiden. Ook zal deze informatie de opzet van toxicologische studies kunnen sturen. Zo kan bij onderzoek van reeds gebruikte stoffen gericht gekeken worden aan welke dosis mensen zijn blootgesteld. Kennis over deze dosis kan helpen om een relevante test dosis te kiezen binnen toxicologische studie. Daarnaast gaat men er vanuit dat een beter begrip van toxicologische pathways en meer biomarkers die gevonden zullen worden die blootstelling bij de mens, het effect van stoffen op de mens of gevoeligheid van bepaalde individuen in de populatie, kunnen aantonen. Tot slot kan informatie over blootstelling helpen om op beleidsniveau beslissingen te nemen bijvoorbeeld voor bepaalde beroepsgroepen.

Een exponent van de paradigma verandering in het veiligheidsonderzoek en de risico beoordeling is het ASAT initiatief (Assuring Safety without Animal Testing) in Nederland. Ook in dit programma staat de mechanistische benadering in het onderzoek centraal. Uitgangspunt van ASAT<sup>97</sup> is het aanvaardbare risico voor mens of milieu; het risico van blootstelling aan een stof wordt van tevoren benoemd en vervolgens beoordeeld in nieuw ontwikkelde innovatieve methoden. Uiteindelijk doel is door een geïntegreerde toepassing van genomics technologieën, geavanceerde informatie technologie en systeembioïologie nieuwe experimentele modellen te

---

<sup>96</sup> NRC. Toxicity Testing in the 21<sup>st</sup> Century: a Vision and a Startegy. The National Academies Press, Washington DC. ISBN 0-309-10992-2

<sup>97</sup> <http://www.asat-initiative.eu/ASAT%20Final%20Report.pdf>

ontwikkelen die gegevens genereren voor deze nieuwe methoden van risico beoordeling. Dit moet enerzijds leiden tot een betere risico schatting en een betere garantie van veiligheid en anderzijds het genereren van data door methoden die niet meer afhankelijk zijn van proefdiergebruik.

#### De consistency benadering in de vrijgiftecontrole van geproduceerde vaccins

Tot op heden gaat de wettelijk verplichte vrijgifte van een nieuw geproduceerde partij vaccin uit van de uniekheid van het product. Om die reden wordt een uitgebreide controle van het eindproduct op veiligheid en werkzaamheid noodzakelijk geacht. Omdat een belangrijk deel van dit onderzoek op diermodellen is gebaseerd, is als gevolg daarvan het proefdiergebruik voor de eindcontrole omvangrijk. Daarnaast gaat het vaak om belastende testen. In de consistency benadering staat het aantonen van consistentie in de productie en het productproces centraal. Daarbij wordt de kwaliteit van een partij vaccin gerelateerd aan een voorgaande partij die op basis van uitgevoerd onderzoek bewezen heeft veilig en werkzaam te zijn (in het navolgende aangeduid als de 'referentie'). Hiervoor kan een klinische lot worden gebruikt die ten grondslag heeft gelegen aan de registratie van het vaccin of een gebruikte partij waarvan retrospectief kan worden aangetoond dat het een veilig en werkzaam product is, onder andere op basis van resultaten in het doeldier (voor humane vaccins: de mens). Voor het onderzoek op de 'referentie' zijn naast diertesten en klinische studies in het doeldier ook testen gebruikt die het product kunnen karakteriseren. Deze laatste testen bestaan vooral uit (proefdiervrije) fysisch-chemische en immuno-chemische technieken<sup>98</sup>, zoals biosensor analyse, immunoblotting, fluorescentie, spectrometrie, en andere. Vrijgifte controle van geproduceerde partijen vaccin zal bestaan uit het aantonen dat deze partijen voor wat betreft de karakteristieken niet afwijken van de uitvoerig geteste 'referentie'. Op basis van deze benadering blijft proefdiergebruik beperkt tot de 'referentie' partij vaccin.

De consistentie benadering wordt inmiddels al toegepast bij de nieuwe generatie vaccins. De geïnterviewden zijn van mening dat ook voor de klassieke vaccins de benadering realistisch wordt, te beginnen met de humane vaccins. De productie van deze vaccins is gestandaardiseerd, er vindt al een uitvoerige in-process controle plaats en in de productie zijn kwaliteitssystemen als current Good Manufacturing Practice (cGMP) en Quality Assurance (QA) van toepassing. Implementatie van de consistentie benadering in de vrijgifte controle zal tot een aanzienlijke daling in het proefdiergebruik leiden<sup>99</sup>. Acceptatie door regelgevende autoriteiten zal echter noodzakelijk zijn op internationaal niveau en dit kan vertragend werken op de implementatie van de consistency benadering in het vaccin vrijgifte onderzoek.

#### *4.3.4 De dierproef als confirmatie model*

Tot voor 50 jaar geleden was er weinig anders voor het onderzoek beschikbaar dan het diermodel. Die situatie is veranderd. Tegenwoordig is er een groot scala aan modellen voorhanden, variërend van weefselkweek tot computermodellen en van fysisch-chemische methoden tot ongewervelde organismen. Deze proefdiervrije

---

<sup>98</sup> Metz B., Hendriksen C.F., Jiskoot W., Kersten G.F. (2002). Reduction of animal use in human vaccine quality control. *Vaccine*. 20 : 2411-30

<sup>99</sup> Hendriksen C.F.M., Arciniega J.L., Bruckner L., Chevalier M., Coppens E., Descamps J., Duchene M., Dusek D.M., Halder M., Kreeftenberg H., Maes A., Redhead K., Ravetkar S.D., Spieser J-M, Swam H. (2008) The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals* 36 (1): 73-77.

methoden lenen zich vooral voor het beantwoorden van deelaspecten van de overkoepelende onderzoeksvraag. Alleen in die gevallen dat de resultaten van de proefdier vrije modellen daartoe aanleiding geven, zal worden overgegaan tot onderzoek in het complexe organisme zoals het proefdier.

Door in het onderzoekstraject een hiërarchische structuur aan te brengen is het mogelijk om na elke onderzoekstap een afweging in te bouwen over de volgende stap in het traject. Zo wordt een beslisboom gecreëerd die het mogelijk maakt onnodig proefdiergebruik te voorkomen, de onderzoeksvraag in geval van proefdiergebruik nader te specificeren en uiteindelijk het proefdiergebruik te beperken.

Volgens geïnterviewden doet deze ontwikkeling zich ook in meer of mindere mate voor in veel gebieden van het fundamenteel onderzoek voor. De proefdier vrije methoden spelen daarbij vooral een rol van hypothesevorming en onderbouwing. De uiteindelijke dierproef dient daarbij ter confirmatie en integratie van de met *in vitro* methoden gevonden resultaten. Eerlijkheidshalve dient hierbij aan toegevoegd te worden dat ook het omgekeerde kan gebeuren en resultaten uit *in vitro* werk additionele onderzoeksvragen zullen initiëren en derhalve mogelijk ook aanvullend dierexperimenteel onderzoek.

In het toegepast onderzoek wordt de hiërarchische structuur ook wel aangeduid als Tiered testing approach en hebben proefdier vrije methoden vooral een (pre-)screeningsfunctie doordat ze een selectie in stoffen mogelijk maken die uiteindelijk in een dierproef getoetst moeten worden. Tiered testing speelt een belangrijke rol in het geneesmiddelen onderzoek middels de high-throughput benadering (hoofdstuk 7.2). Door stoffen eerst op een aantal essentiële eigenschappen te karakteriseren met behulp van (fysisch-)chemische methoden, *in vitro* receptor bindingsstudies en in weefselkweek is het mogelijk het aantal benodigde dieren per potentieel geneesmiddel (lead verbinding) te beperken<sup>100</sup>. Ook in het toxicologisch onderzoek heeft de Tiered testing benadering een plaats gevonden. Voorbeelden zijn de onderzoeksopzetten die gekozen zijn voor het oog-irritatie onderzoek in het konijn en voor het onderzoek naar eco-toxiciteit.

De tiered testing benadering voor het oog-irritatie onderzoek volgt de onderstaande strategie<sup>101</sup>. Allereerst wordt op basis van structuur activiteit relatie beoordeeld of de stof een mogelijke corrosieve of irriterende werking heeft. Indien dit zo is, zal verder geen onderzoek meer met de stof plaatsvinden. Bij een negatief resultaat wordt vervolgens gekeken naar de fysisch-chemische en chemische activiteit van de stof. Bij een  $\text{pH} \leq 2.0$  of  $\geq 11.5$  zal de stof niet verder worden onderzocht. Indien dit niet zo is zal verder onderzoek in *in vitro* of *ex vivo* modellen plaatsvinden. Bij een positief resultaat wordt de stof niet verder onderzocht. Bij een negatief resultaat zal allereerst *in vivo* onderzoek op huidirritatie of huidcorrosiviteit plaatsvinden. Ook hiervoor geldt dat alleen bij negatief resultaat verder onderzoek in proefdieren plaats vindt. Allereerst wordt een oog-irritatietest in 1 dier uitgevoerd. Bij een positief resultaat wordt de stof als oog-irritant gezien. Bij een negatief resultaat wordt een confirmatie test in 2 extra konijnen uitgevoerd.

Geïnterviewden verwachten dat verdere optimalisatie van *in vitro* modellen (bijvoorbeeld door het gebruik van tissue engineering) en computer modellen (zoals door ontwikkelingen op het gebied van QSARs) zal leiden tot het verdere verschuiving van het dierexperimenteel onderzoek naar het einde van het

---

<sup>100</sup> Verboost P.M., Van der Valk J. & Hendriksen C.F.M. (2007). Effects of the introduction on *in vitro* assays on the use of experimental animals in pharmacological research. ATLA, 35, 2: 223-229.

<sup>101</sup> <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg405.pdf>

onderzoekstraject. Aangenomen mag worden dat door de verfijning van de onderzoeksvraag die hierbij optreedt het uiteindelijke aantal benodigde dieren zal doen afnemen.

### **4.4 Samenvatting**

In dit hoofdstuk zijn de ontwikkelingen en trends besproken die kunnen leiden tot een toename of een afname in het aantal dierproeven. Volledigheid is niet mogelijk. Zo vinden op allerlei terrein ontwikkelingen plaats die een beperkte toe- of afname in het aantal dierproeven met zich meebrengt. Dit geldt onder andere voor de recente uitbraak van Mexikaanse griep. Hoewel deze uitbraak maatschappelijk en wetenschappelijk veel activiteiten heeft gegenereerd is de omvang van het uitgevoerde dierexperimenteel onderzoek (o.a. met betrekking tot bestudering ziekteverloop, diagnostiek en vaccinontwikkeling) beperkt gebleven, zeker wanneer dit wordt afgezet tegen het totaal aan onderzoek.

De scheiding tussen ontwikkelingen die leiden tot een toename of afname in het aantal dierproeven is niet altijd absoluut. Zo wordt de komende jaren in internationaal verband een 3V alternatief voor het werkzaamheidsonderzoek van het kinkhoestvaccin gevalideerd. Deze validatie zal het noodzakelijk maken om voor een aantal producten de werkzaamheid ook in de klassieke diertest te meten, resulterend in additioneel gebruik van enkele duizenden dieren.

Binnen het domein Dierproeven zijn een groot aantal ontwikkelingen en trend sbenoemd. In Hoofdstuk 8 van dit rapport zijn deze samengevat (Tabel 8.2.). Er wordt een verwachting uitgesproken over de status van de ontwikkeling in 2020, de peildatum van deze studie. Verder worden mogelijke factoren genoemd die trends kunnen sturen of afremmen.



## 5 Alternatieven voor dierproeven: Ontwikkelingen en trends

### 5.1 Inleiding

Voor wat betreft het begrip 'alternatieven voor dierproeven' zijn we schatplichtig aan de Engelse wetenschappers Russell en Burch en aan Smyth. Russell en Burch introduceerden in 1959<sup>102</sup> het principe van de 3Vs: Vervanging, Vermindering en Verfijning. Vervolgens werden deze in 1978 door Smyth<sup>103</sup> samengevat onder het begrip 'Alternatieven voor dierproeven'. 'Alternatieven voor dierproeven' is inmiddels een geaccepteerde benadering in het onderzoek. Onder Vervanging worden die methoden of benaderingen verstaan die het proefdiergebruik in het onderzoek kunnen doen vervangen door ongewervelde organismen of niet biologisch materiaal. Vermindering betekent het verminderen van het aantal dieren dat nodig is voor beantwoording van de wetenschappelijke vraag. Verfijning ten slotte is gericht op het verminderen van ongerief in het experiment of het verhogen van het welzijn van de dieren. In het navolgende zal de term 3V alternatieven worden gebruikt als alternatieven voor dierproeven worden bedoeld. Hoewel niet als zodanig omschreven waren 3V alternatieven al ruim bekend voor de introductie van het begrip. Voorbeelden die reeds in de 19e eeuw toepassing vonden zijn het gebruik van analgetica of de vervanging van proefdieren voor de kweek van pathogene bacteriën door voedingsbodems. Voorbeelden van 3V alternatieven die voor enkele gebieden van het regulatorisch onderzoek recent toepassing hebben gevonden worden gegeven in tabellen 1 en 2 van Bijlage 8.

Toepassing van 3V alternatieven is de verantwoordelijkheid van de individuele onderzoeker, maar deze is wel gebonden aan de Wet op de dierproeven<sup>104</sup>, art. 10, lid 1a: 'Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is'. In concreto betekent dit dat de dierproef het alternatief is en het 3V alternatief de eerst aangewezen methode. Inventariserende studies<sup>105</sup> hebben laten zien dat onderzoekers niet altijd op de hoogte zijn van beschikbare 3V alternatieven. Een gerichte training onder andere in het gebruik van literatuur zoeksystemen, zou een bijdrage kunnen leveren aan een effectieve implementatie van 3V methoden in het onderzoek (zie ook 3.3.4.).

Verwacht mag worden dat de druk op de ontwikkeling en toepassing van 3V alternatieven de komende jaren zal blijven en zelfs zal toenemen. Een aanwijzing hiervoor is de concept revisie tekst van de Europese Directieve 86/609/EEC. Expliciete aandacht is hierin voor 3V expertise binnen

---

<sup>102</sup> Russell W MS and Burch RL. Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, UK

<sup>103</sup> Smyth DH. (1978) Alternatives to Animal Experiments. Scolar Press, London. ISBN 0 85967 396 0

<sup>104</sup> [http://wetten.overheid.nl/BWBR0003081/geldigheidsdatum\\_23-11-2009](http://wetten.overheid.nl/BWBR0003081/geldigheidsdatum_23-11-2009)

<sup>105</sup> Leenaars M, Savenije B, Nagtegaal A. et al. (2009). Assessing the search for and implementation of the Three Rs: a survey among scientists. *Altern.Lab.Anim.* 37(3): 297-303

onderzoeksinstellingen, voor de validatie van 3V methoden en voor verfijningsmaatregelen als het gebruik van humane eindpunten. Ook in beleidsprogramma's van internationale regelgevende organisaties als OECD en Europese Pharmacopee of van overkoepelende wetenschappelijke organisaties als de European Science Foundation (ESF)<sup>106</sup> staan de 3Vs centraal. Belangrijk is te constateren dat deze aandacht niet alleen wordt ingegeven door dierethische motieven, ook de wetenschappelijke meerwaarde die 3V methoden kunnen hebben, komen in toenemende mate onder de aandacht.

In het navolgende zal een overzicht worden gegeven van ontwikkelingen en trends op het gebied van de 3V alternatieven. Hoewel de aspecten Verfijning en Vermindering al zijn uitgewerkt in de hoofdstukken 3 (Proefdieren) en 4 (Dierproeven) zullen de belangrijkste bevindingen in dit hoofdstuk kort worden samengevat. Het accent in dit hoofdstuk zal echter liggen op de Vervangingsalternatieven. Een onderscheid kan worden gemaakt tussen absolute en relatieve vervanging<sup>107</sup>. In geval van absolute vervanging wordt het proefdier vervangen door niet biologisch materiaal, door ongewervelde dieren of door het gebruik van humaan weefsel. Bij een relatieve vervanging is gebruik van dieren op enigerlei wijze noodzakelijk voor het verkrijgen of in stand houden van het vervangingsalternatief. Een voorbeeld van deze laatste categorie is de primaire celweek of cellijn van weefsel van laboratorium dieren. De indeling die in dit hoofdstuk wordt gehanteerd, is gekoppeld aan de vervangingsmethode. Achtereenvolgens komen de volgende onderwerpen onder de aandacht:

- Ongewervelde organismen
- Immuno-chemische en fysisch-chemische methoden
- In silico modellen
- Slachthuis materiaal
- Menselijk vrijwilligers
- Omics technologieën
- Weefselkweek

Bovenstaande methoden gaan uit van een vervanging van een bestaande diertest door een vervangingsalternatief. Een benadering die afwijkt van deze 1 op 1 ontwikkeling (directe vervanging) gaat uit van een wijziging in de onderzoekstrategie waardoor dierexperimenteel onderzoek niet meer noodzakelijk is. In dit geval wordt gesproken over indirecte vervanging. Deze benadering is toegelicht in hoofdstuk 4.3.3. 'wijziging in onderzoeksstrategie en test paradigma'.

### 5.2 Verfijning

Voor verfijning, maar ook voor vermindering geldt dat deze aspecten betrekking dienen te hebben op de hele levenscyclus van het proefdier, dat wil zeggen niet alleen in de onderzoeksfase maar ook in de fok en voor de dieren in voorraad.

Verfijnings maatregelen in het dierexperimenteel onderzoek kunnen gerelateerd zijn aan het verminderen van het ongerief van de dieren en/of

---

<sup>106</sup>[http://www.esf.org/index.php?elD=tx\\_nawsecuredl&u=0&file=fileadmin/be\\_user/CEO\\_Unit/Science\\_Policy/ESPB15.pdf&t=1259058368&hash=88276fb1e01fa868ede56749a441adfb](http://www.esf.org/index.php?elD=tx_nawsecuredl&u=0&file=fileadmin/be_user/CEO_Unit/Science_Policy/ESPB15.pdf&t=1259058368&hash=88276fb1e01fa868ede56749a441adfb)

<sup>107</sup> Balls M. (2009). The Three Rs and the Humanity Criterion. An Abridged version of The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S.Russell and R.L.Burch. FRAME, Nottingham (UK), ISBN 978-0-9501700-2-2.

het maximaliseren van het welzijn. Voorbeelden van de eerste categorie zijn het gebruik van adequate anesthesie en/of pijnbestrijding, de toepassing van humane eindpunten of het hanteren van maximale inspuitvolumina. Bij het maximaliseren van welzijn kan onder andere gedacht worden aan het mogelijk maken van soortspecifieke gedragingen zoals door het beschikbaar stellen van kooiverrijdingsmaatregelen. Conditionele maatregelen voor een optimale implementatie van verfijnings mogelijkheden zijn onder andere een gerichte educatie en training en het hanteren van Codes of current best practice.

Als de voorgestelde revisie van de Europese Directieve 86/609/EEC als referentiepunt wordt genomen, dan mag verwacht worden dat het aspect Verfijning van dierexperimenteel onderzoek de komende jaren in belang zal toenemen. Zo gaat de revisie uit van het instellen bij fok en onderzoekinstellingen van een zogenaamde 'animal welfare body'. De voorgestelde taken van dit orgaan liggen niet alleen op het vlak van het passief monitoren van het welzijn van dieren in experimenten, maar gaan ook over het adviseren met betrekking tot proefdierhuisvesting en verzorging, alsmede de toepassing van 3V alternatieven. In het kielzog van de revisie zullen bestaande procedures rondom dierproeven kritisch worden gezien en waar mogelijk gewijzigd.

Andere trends die de komende jaren doorgang zullen vinden is het gebruik van beeldvormende technieken en niet-invasieve meetmethoden en het onderzoek naar de effecten van experimentele procedures en condities op de resultaten van het onderzoek. Voor een uitgebreidere toelichting wordt de lezer verwezen naar Hoofdstuk 3.

### **5.3 Vermindering**

Vermindering impliceert dat proefdieren nog steeds nodig zijn voor de uitwerking van de onderzoeksvraag. Algemene opmerkingen zoals genoemd aan het begin van de paragraaf over verfijning (5.3.2.) zijn dan ook onverminderd van kracht als verminderingsalternatieven worden geïntroduceerd. Tussen vermindering en verfijning kan een spanningsveld optreden. De kans hierop kan groter worden naarmate dieren intensiever worden gebruikt, bijvoorbeeld doordat beeldvormende technieken worden ingezet of dieren continue worden gemonitord met behulp van telemetrie.

Vermindering is een noodzakelijk streven, maar dient niet te interfereren met de validiteit van de uitspraak die aan de onderzoeksresultaten wordt toegekend. Met andere woorden, een verlaging van het aantal dieren onder het noodzakelijke aantal is meer een voorbeeld van incompetent proefdierbeleid dan van adequate aandacht voor de V van vermindering.

Evenals verfijning is ook vermindering de primaire verantwoordelijkheid van de individuele onderzoeker. Vermindering dient te starten bij de voorbereiding van een experiment. Aanvullende kennis over de onderzoeksvraag kan worden gegenereerd door een uitvoerige literatuurstudie. Daar waar kennis ontbreekt, bijvoorbeeld met betrekking tot de experimentele opzet of statistische analyse dient deze kennis te worden 'ingehuurd'. Een kritische analyse van het uit te voeren dierexperiment is eveneens van belang waarbij alle mogelijkheden van de 3Vs aan de orde moeten komen. Voor routinematig onderzoek is het aan te bevelen diermodellen periodiek tegen het licht van de 3Vs te plaatsen en waar mogelijk up-to-date te maken voor wat betreft ontwikkelingen en best practices. Belangrijk is ook om fundamentele

aspecten van het gebruikte diermodel mee te nemen in de beschouwing en te bekijken of de onderzoeksvraag ook beantwoord kan worden door een andere onderzoeksstrategie toe te passen. Voor een uitvoerige beschrijving van deze mogelijkheden wordt de lezer verwezen naar Hoofdstuk 4 van dit rapport.

### 5.4 Vervangingsalternatieven

Overeenkomstig art 1 Wod is een proefdier een levend gewerveld dier, dan wel een levend ongewerveld dier van een bij algemene maatregel van bestuur aangewezen soort dat voor in de wet omschreven doeleinden wordt gebruikt<sup>108</sup>. Tot op heden zijn geen ongewervelde soorten in de wet opgenomen. Als criterium voor het begrip 'levend' wordt de omschrijving 'levensvatbaar van de vrucht/larve' gehanteerd. Op moment van schrijven verkeert de revisie van de Europese Directieve 86/609/EEC in een eindfase. Mocht deze revisie door het Europees Parlement en de Raad van Ministers worden goedgekeurd dan zullen vertebraten in foetale stadia vanaf 2/3 van de ontwikkeling en in zelfstandig levende larvale stadia onder de wet komen te vallen alsmede bepaalde categorieën ongewervelde dieren.

Uitgaande van bovenstaande, in de Wod gehanteerde, afbakening is een vervangingsalternatief elke methode of benadering die gebruik maakt van ongewervelde organismen, organismen in niet levensvatbare foetale/larvale stadia en niet biologisch materiaal. Wijzigingen hierop zijn in de nabije toekomst te verwachten, waarbij in specifieke gevallen thans bestaande alternatieve methoden mogelijk gaan worden beschouwd als een dierproef.

In de onderstaande bespreking zullen trends en ontwikkelingen worden beschreven aan de hand van de volgende categorieën vervangingsalternatieven:

- Ongewervelde organismen
- Immuno-chemische en fysisch-chemische methoden
- *In silico* methoden
- Slachthuis materiaal
- Menselijk vrijwilligers
- Omics technologieën
- Weefselkweek

#### 5.4.1 Ongewervelde organismen

Zoals vermeld vallen ongewervelde organismen niet onder de Wod. Voor sommige soorten en ondersoorten kan dit veranderen na de inwerkingtreding van de gewijzigde Council Directive 86/609/EEC, in het bijzonder de Cephalopoda (inktvis) en de Decapoda crustacea van de infraorder Brachyura (krab) and Astacidea (kreeft)

Tot op heden echter zijn alle ongewervelden te wettelijk te beschouwen als een vervangingsalternatief, wat onverlet laat dat over relevante aspecten als ongerief en pijn weldegelijk ook spelen voor onderzoek op categorieën ongewervelden. Er zijn diverse voorbeelden van onderzoeksmodellen te geven waarbij ongewervelde organismen worden gebruikt, soms als volwaardige vervanging van een dierproef, zoals bij het onderzoek op pyrogeniteit (lichaamstemperatuur verhoging), of als screeningsmodel in een tiered test benadering waarbij een positief resultaat in de test met ongewervelden verder *in vivo* onderzoek overbodig maakt. Dit geldt

---

<sup>108</sup> [http://wetten.overheid.nl/BWBR0003081/geldigheidsdatum\\_25-11-2009](http://wetten.overheid.nl/BWBR0003081/geldigheidsdatum_25-11-2009)

bijvoorbeeld voor de Ames test ten behoeve van het onderzoek op genotoxiciteit uit 1963. De Ames test maakt gebruik van de bacterie *Salmonella typhimurium* die genetisch zo veranderd is dat voor de groei histidine in de voedingsbodem nodig is<sup>109</sup>. Onder invloed van mutagene stoffen treedt een terugmutatie op waardoor gemuteerde bacteriën wel op een histidine vrij medium kunnen groeien maar niet gemuteerde bacteriën niet. Op basis van een positief resultaat, waarbij gemuteerde bacteriën zijn aangetoond, wordt de stof als genotoxisch beschouwd. Een beperking van de Ames test is dat de methode vooral bruikbaar is voor stoffen die een puntmutatie laten zien (mutagene veranderingen aan één of enkele genen) maar beperkte gevoelig is voor clastogene stoffen (stoffen die chromosoom breuken induceren). Andere voorbeelden van ongewervelden zijn de *Drosophila* en *C.elegans* welke vooral voor genetisch onderzoek worden gebruikt of slakken, planten, gisten en schimmels voor toxiciteitonderzoek<sup>110</sup>. In het (eco-)toxiciteitonderzoek wordt veel gebruik gemaakt van onderzoek in *Daphnia* (watervlooien), ook hier in een tiered test benadering. Onderzoek in vissen wordt gestuurd op basis van de resultaten behaald in de *Daphnia* test<sup>111</sup>.

Een test binnen het geneesmiddelen onderzoek waarbij gebruik wordt gemaakt van materiaal (bloed) afkomstig van een ongewerveld organisme; de Degenkrab, is de *Limulus Amoebocyte Lysaat* (LAL) test. Deze LAL test heeft het afgelopen decennium in belangrijke mate het gebruik van konijnen voor het onderzoek op pyrogene stoffen (voornamelijk endotoxinen\*). Onderzoek op pyrogeniteit (lichaamstemperatuur verhoging) is onderdeel van het wettelijk verplicht veiligheidsonderzoek op injecteerbare geneesmiddelen, biologische producten en bloedproducten. De laatste jaren is er gewerkt aan de vervanging van de LAL test door een *in vitro* test op basis van een cellijn (monocyten)\*\*<sup>112</sup> of menselijk bloed<sup>113</sup>. Achterliggende redenen zijn dat de LAL test niet voor alle producten werkt<sup>114</sup>, gebruik maakt van materiaal van een dier met grote natuurhistorische waarde en soms vals positieve resultaten geeft. In de *in vitro* alternatieven wordt de inductie van specifieke cytokines (eiwitten die een signaalfunctie hebben in de immuunrespons) onder invloed van pyrogene stoffen als biomarker gebruikt. Inmiddels verkeert het validatieonderzoek van deze modellen in een vergevorderd stadium en naar het zich laat aanzien zullen de genoemde *in vitro* testen de komende jaren de LAL test geleidelijk doen vervangen.

Voor het overige, is de algemene verwachting onder geïnterviewden, zullen ontwikkelingen en trends in het gebruik van ongewervelde dieren als vervangingsalternatief beperkt blijven.

---

<sup>109</sup> Ames B.N., Hartman P.E., Jacob F. (1963). Chromosomal alterations affecting the regulation of histidine biosynthetic enzymes in *Salmonella*. *J.Mol.Biol.* 7: 23-42.

<sup>110</sup> Mihaich E.M., Friederich U., Caspers N. et al. (2009). Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *72*(5): 1392-1399.

<sup>111</sup> Bradbury S.P., Feijtel T.C., van Leeuwen C.J. (2004). Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context *Environ.Sci.Technol* 38(23): 463A-470A.

\* een toxine uit de wand van sommige bacteriën dat onder andere koorts induceert

\*\* een type witte bloedcel die vooral betrokken is bij het opruimen van ziektekiemen

<sup>112</sup> Montag T., Spreitzer I., Löschner B. et al. (2007). Safety testing of cell-based medicinal products: opportunities for the monocyte activation test for pyrogens. *ALTEX* 24 (2): 81-89.

<sup>113</sup> Daneshian M., von Aulock S., Hartung T. (2009) Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nat.Protoc.* 4(12): 1909-1721.

<sup>114</sup> Mascoli C.C., Weary M.E. (1979). Applications and advantages of the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products. *Prog.Clin.Biol.Res.* 29: 387-402.

#### 5.4.2 Immuno-chemische en fysisch-chemische technieken

Een onderscheid wordt gemaakt tussen immuno-chemische technieken waarbij de meetmethoden gebruik maken van immunogene eigenschappen van de stof terwijl bij de fysisch-chemische technieken de fysische eigenschappen centraal staan.

##### Immunochemische technieken

Onder immunologische technieken worden laboratorium technieken verstaan die een deelaspect van een immuunreactie kunnen kwalificeren en/of kwantificeren. Veel van deze technieken behoren tot het standaard arsenaal van methoden die worden ingezet voor het fundamenteel onderzoek en de diagnostiek, zoals voor de bestudering van immuunresponsen, de interactie tussen cellen van het immuunsysteem door cytokines of de differentiatie tussen micro-organismen. Algemeen gangbare immunochemische technieken zijn ELISA, haemagglutinatie, immunoblotting. Een grote doorbraak in het gebruik van immunochemische technieken is de ontwikkeling in 1975 van monoclonale antistoffen geweest<sup>115</sup>. Monoclonale antistoffen zijn antilichamen die gericht zijn tegen één specifieke bindingsplaats op het ook wel epitoom genoemd (een antigeen is een lichaamsvreemde stof, bijvoorbeeld gebonden aan een pathogeen, die in staat is om een reactie van het afweersysteem op te wekken, waarbij antistoffen worden geproduceerd). Toepassing van monoclonale antistoffen hebben een grote bijdrage geleverd aan een verbetering van de specificiteit van de immunochemische technieken.

Een antistof wordt geproduceerd door een antistofproducerende cel (B-cel of plasma cel) in het lichaam. De cel doet dat nadat er contact is geweest met het antigeen. Iedere B-cel produceert een specifieke (monoclonale) antistof. Bij contact met het antigeen gaat deze B-cel delen (kloneren) waardoor de antistofproductie wordt opgeschaald. Helaas vermeerderen B-cellen zich niet buiten het lichaam. Het lukte Köhler en Milstein om B-cellen te fuseren met tumor (myeloid) cellen. De gefuseerde cellen (hybridoomcellen) hebben zowel de mogelijkheid om buiten het lichaam te delen als om monoclonale antistoffen te produceren. Tot in de jaren negentig vond productie van monoclonale antistoffen plaats door hybridoomcellen in te spuiten in de buikholte van muizen waarna de cellen zich deelden en buikvocht produceerden met een hoge concentratie monoclonale antistoffen. In 1997 heeft de Veterinaire Hoofdinspectie in Nederland een dringend advies afgegeven de belastende productie in muizen te vervangen door productie in celkweken<sup>116</sup>. Inmiddels is *in vitro* productie een algemeen geaccepteerde methode en is een mijlpaal geweest in de acceptatie van vervangingsalternatieven.

Naast de belangrijke rol die immuno-chemische methoden spelen in de diagnostiek en in het klinisch onderzoek, zijn zij ook van belang voor de ontwikkeling van nieuwe vaccins en in het bijzonder voor de vrijgifte controle van vaccins<sup>117</sup>. Bij dit laatste zijn het vooral de antigeniciteitstesten voor het werkzaamheidsonderzoek van vaccins zoals de D-antigeen test voor het polio vaccin als alternatief voor de rattentest, de antigeniciteitstest voor het Hepatitis A en B vaccin of de controle van het Newcastle Disease (kippen)vaccin<sup>118</sup>. Bij antigeniciteitstesten vindt een kwantificering van de dosis antigenen in het vaccin plaats, vaak op basis van binding van het antigeen aan

---

<sup>115</sup> Köhler G. and Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497.

<sup>116</sup> Hendriksen CFM, Rozing J, Kamp van der M and de Leeuw W. The production of monoclonal anti-bodies: are animals still needed? (1996) *ATLA* 24: 109-110.

<sup>117</sup> Hendriksen CF. (2009). Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev.Vaccines* 8(3): 313-322.

<sup>118</sup> Claassen I, Maas R, Oei H et al. (2004). Validation study to evaluate the reproducibility of a candidate *in vitro* potency assay of newcastle disease vaccines and to establish the suitability of a candidate biological reference preparation. *Pharmeuropa Bio* 1: 1-14.

relevante monoclonale antistoffen. Vanuit de methodiek is de antigeniciteitstest een niet functionele methode, dat wil zeggen er wordt informatie verzameld over het bindingsvermogen van et antigeen maar niet over de biologische activiteit van het antigeen. Kleine veranderingen aan het antigeen kunnen dan ook gevolgen hebben voor de uitkomst van de antigeniciteitstest terwijl dit geen gevolgen hoeft te hebben voor de *vivo* werkzaamheid. Dit kan bijvoorbeeld het gevolg zijn in het stabiliteitsonderzoek van vaccins. Deze mogelijke effecten dienen meegenomen te worden in validatie studies waar een vergelijking van de *in vitro* methode aan de diertest plaats vindt. Niettemin verwachten geïnterviewden de komende jaren een toename in het gebruik van antigeniciteitstesten, vooral als onderdeel van een nieuwe strategie in de vaccin controle, de consistency benadering (zie 4.3.3.3). Een parallelle ontwikkeling is innovatie in immuno-chemische methoden waardoor deze methoden sneller en makkelijker worden in de uitvoering of naast kwantitatieve informatie ook kwalitatieve informatie geven, dat wil zeggen informatie over de biologische activiteit van het antigeen of antistof. Voorbeelden hiervan zijn de Biacore technologie (Biosensor analyse) en het gebruik van Luminex immunoassays technieken waarmee het mogelijk is simultaan kleine volumina van een groot aantal monsters te testen. Luminex wordt daarom vooral gebruikt voor de highthroughput screening van antigenen in het kader van de diagnostiek, voor cytokinen bepalingen of in de farmacologie voor receptor-ligand bindingsassays).

### Fysisch-chemische methoden

Fysisch-chemische methoden kunnen informatie verschaffen over het gedrag en eigenschappen van een stof onder bepaalde omstandigheden. Er bestaat een breed scala aan methoden waarvan de keuze bepaald wordt door het toepassingsdomein. Binnen het toxicologische onderzoek, met name in de tiered strategy benadering, worden fysisch-chemische methoden vaak voor pre-screenings doeleinden gebruikt. Voorbeelden hiervan zijn in voorgaande hoofdstukken gegeven, zoals in het oog-irritatie onderzoek waarbij screening plaats vindt op basis van de zuurgraad van een stof (paragraaf 4.4.3). Ook vormen fysisch-chemische eigenschappen belangrijke parameters voor QSAR databanken.

Tot voor kort beruiste het werkzaamheidsonderzoek voor de vrijgifte van hormoonpreparaten op onderzoek in proefdieren. Zo werd de werkzaamheid van insuline preparaten getest in de zogenaamde muis convulsietest. De introductie van de recombinant techniek heeft inmiddels de traditionele manier van hormoonproductie (isolatie van hormonen uit weefsels of lichaamsvloeistoffen) vervangen. Hierdoor werd het mogelijk constant te produceren onder controleerbare productieomstandigheden. Daarmee verviel de noodzaak tot het gebruiken van een bio-assay (de diertest) voor het onderzoek op werkzaamheid en is voor veel hormoon producten de diertest in de vrijgifte controle vervangen door een fysisch-chemische methode. Recent is dit gebeurd voor het Follikel Stimulerend hormoon (recombinantFSH), waarbij de ratten bioassay met als biomarker het ovarium gewicht vervangen is door de isoelectric focussing techniek, een fysisch-chemische methode<sup>119</sup>. Voor de ontwikkeling van nieuwe hormoonpreparaten blijft een functionele (diertest) veelal wel vereist. De methode, ontwikkeld door Organon, is inmiddels geaccepteerd door de regelgevende autoriteiten.

Ontwikkelingen met betrekking tot fysisch-chemische methoden voor vervanging van dierproeven doen zich vooral voor binnen de categorie van de biologische producten. In perspectief zijn de 3V ontwikkelingen binnen de controle van hormoon preparaten

---

<sup>119</sup> Mulders J.W., Derksen M., Swolfs A., Maris F. (1997). Prediction of the *in vivo* biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. *Biologicals* 25(3): 269-281.

illustratief, vooral omdat de ontwikkelingen indirect gekoppeld zijn aan wijzigingen in het productieproces van hormoonpreparaten<sup>120</sup>.

Een soortgelijke ontwikkeling, ook wel aangeduid met de 'consistency benadering', doet zich momenteel ook voor bij de vrijgifte controle van de conventionele (geïnactiveerde) vaccins. Ook hier is de achtergrond een verbetering van het vaccinproduct, niet door introductie van rDNA technieken maar door optimalisatie en standaardisatie van het productieproces. Essentieel in de consistency benadering is de stapsgewijze monitoring van het vaccin product tijdens het productie proces met behulp van immuno-chemische en fysisch-chemische methoden (zie ook Hoofdstuk 4.3.3.3.). Fysisch-chemische methoden die hiervoor kunnen worden gebruikt zijn massa spectrometrie, elektroforese, chromatography en andere<sup>121</sup>. De verwachting is dat de komende jaren de gevoeligheid van de meetapparatuur zal verbeteren en ook de toepasbaarheid voor complexe moleculen verbeterd zal worden, onder andere door een verbeterde databewerking.

Fysisch-chemische methoden zijn kwantitatief van aard en geven geen informatie over bio-activiteit. Ze kunnen dan ook alleen worden ingezet op voorwaarde van bewezen functionaliteit van het product in de ontwikkelingsfase en bewezen consistentie in de partijgewijze productie. Wijzigingen in het productieproces maken een nieuwe toetsing van het product in een functionele (dier)test noodzakelijk.

### 5.4.3 *In silico* modellen

Het begrip '*in silico*' verwijst naar methoden of benaderingen waarin gebruik van computer-hardware en software centraal staat. In het onderstaande wordt ingegaan op het gebruik van de computer voor audio-visuele programma's, voor data-bases, computermodellering en mathematische modellering.

Computertoepassingen vormen een zeer divers en zich snel ontwikkelend veld binnen het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven. De kanttkening die daarbij gemaakt moet worden, is dat *in silico* programma's veelal niet anders doen dat het op een gestandaardiseerde, intelligente en snelle manier combineren, integreren, analyseren en bewerken van informatie die veelal uit dierexperimenteel onderzoek verkregen is. In de meest simpele vorm kunnen deze toepassingen bestaan uit programma's bedoeld voor trainings- of opleidingsdoeleinden. Inmiddels zijn divers interactieve programma's beschikbaar, op het gebied van anatomie, fysiologie of farmacologie. Een overzicht hiervan kan worden gevonden op de website van het NCA<sup>122</sup> of staan beschreven in het boek 'From Guinea Pig to Computer Mouse', uitgegeven door de organisatie InterNICHE<sup>123</sup>. Een nieuwe ontwikkeling is het beschikbaar komen van on-line trainingsmodules, onder andere in 3V alternatieven. Een organisatie die actief aan de ontwikkeling hiervan werkt is de Canadian Council on Animal Care (CCAC)<sup>124</sup>.

Over het belang van literatuuronderzoek in de planningsfase van het onderzoek is reeds in de inleiding van dit hoofdstuk geschreven. Inmiddels bestaan er meer dan 100 openbare bibliografische databestanden waar informatie over

---

<sup>120</sup> Garthoff B., Hendriksen C., Bayol A., et al. (1995). Safety and efficacy testing of hormones and related products; ECVAM Workshop Report 9, *ATLA* 23, 699-712

<sup>121</sup> Metz B., Brunel F., Chamberlin C., van der Gun J., et al. (2007). The Potential of Physicochemical and Immunochemical Assays to Replace Animal Tests in the Quality Control of Toxoid Vaccines. *ATLA* 35, 323-331.

<sup>122</sup> [http://www.vet.uu.nl/nca/nca/links/3rs\\_in\\_education/3r\\_models\\_in\\_education](http://www.vet.uu.nl/nca/nca/links/3rs_in_education/3r_models_in_education)

<sup>123</sup> <http://www.interniche.org/book.html>

<sup>124</sup> [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/ETCC/Intro-coretopics-Web11.htm](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/ETCC/Intro-coretopics-Web11.htm)

vervangingsalternatieven te vinden is. Sommige van deze databases zijn algemeen zoals Medline en PubMed en sommige specifiek gericht op 3V alternatieven zoals AltWeb<sup>125</sup>, de NCA database<sup>126</sup>, BrF-ZEBET database<sup>127</sup> en de ECVAM-JRC database<sup>128</sup>. Databases zijn niet altijd overlappend hetgeen min of meer onoverkomelijk is. Wel zijn geïnterviewden van mening dat er minder behoefte is aan nieuwe databases dan aan het aanbrengen van links tussen de data bases en het opstellen van slimme zoekstrategieën. Het aanbieden van trainingsmogelijkheden in het gebruik van zoekstrategieën wordt als een belangrijk voorwaarde beschouwd.

Een bijzondere vorm van databases zijn die ten behoeve van de QSARs. QSARs worden vooral gebruikt in het toxicologisch en farmacologisch onderzoek waarbij zij gebruik maken van het gegeven dat er voor een chemische stof een relatie bestaat tussen moleculaire structuur en de chemische en biologische eigenschappen van die stof. De hypothese is dat als het mogelijk is een onbekende stof op basis van de moleculaire structuur binnen een specifieke groep (domein) van stoffen te plaatsen en de biologische effecten van analoge verbindingen uit deze groep bekend is (bijvoorbeeld levertoxiciteit) het dan mogelijk moet zijn om de toxiciteit of andere biologische activiteit (bijvoorbeeld bioaccumulatie waarbij een stof zich ophoopt in een organisme doordat het lichaam de stof niet kan afbreken) van de onbekende stof te voorspellen. Plaatsing van stoffen in een bepaald domein gebeurt op basis van de moleculaire structuur en fysische eigenschappen (pH, smeltpunt, partitie coëfficiënt tussen lipofiele en niet lipofiele\* stoffen (Pow), e.a.) van de stof en eventueel resultaten van *in vitro* onderzoek. Door mathematische modellering kan de structuur van de stof vervolgens worden gerelateerd aan het waarschijnlijke biologische effect/toxicologische eindpunt<sup>129</sup>. Inmiddels zijn er diverse (commerciële) QSARs beschikbaar, meestal in relatie tot specifieke eindpunten, zoals DEREK (onder andere huidsensitisatie) of TOPKAT en CASE<sup>130</sup>. Door REACH is de belangstelling voor QSARs sterk toegenomen. Toepassing van QSARs voor classificatie en het labelen van stoffen is vooralsnog beperkt tot eco-toxiciteit. Problemen doen zich voor met betrekking tot de kwaliteit van de data input in de bestaande databases, het ontbreken van model stoffen met een robuuste relatie tussen moleculaire structuur en toxiciteit en informatie over mogelijke biotransformatie<sup>131</sup>. Dat laat onverlet dat, vanwege de snelheid waarmee relevante data worden verkregen, QSARs op grote schaal gebruikt worden in Tiered test approaches voor test prioritering en pre-screening. Zo zijn voor de categorie van milieuverontreinigende stoffen positieve resultaten beschreven, dit in combinatie met onderzoek in niet gewervelde dieren.

Een QSAR benadering vindt toepassing in het farmacologisch onderzoek waarbij de hypothese is dat moleculaire basis van een stof een relatie heeft met de farmacologische activiteit (werkzaamheid) van de stof. Daarbij is veelal bekend wat de bindingsplaats (target) voor het farmacon is: bijvoorbeeld een specifieke receptor of een enzym en beoogt met informatie te verzamelen over de mate van werkzaamheid van het farmacon.

---

<sup>125</sup><http://altweb.jhsph.edu/>

<sup>126</sup>[http://www.vet.uu.nl/nca/alternatives/alternatieven\\_database](http://www.vet.uu.nl/nca/alternatives/alternatieven_database)

<sup>127</sup> <http://www.bfr.bund.de/cd/1508>

<sup>128</sup> <http://ecvam-dbalm.jrc.cec.eu.int/>

\* Lipofielstoffen zijn stoffen die goed mengen met olie en vet, maar niet met water

<sup>129</sup> Nendza, M. & Hermens, J. (1995). Properties of chemicals and estimation methodologies. In *Risk assessment of chemicals. An introduction* (ed. C.J. van Leeuwen & J.L.M. Hermens), pp.239-292. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer

Academic Press.

<sup>130</sup> [https://portal.dimdi.de/websearch/servlet/FlowController/Documents-display#\\_\\_DEFANCHOR\\_\\_](https://portal.dimdi.de/websearch/servlet/FlowController/Documents-display#__DEFANCHOR__)

<sup>131</sup> ECETOX. ECETOC (2003). (Q)SARs: Evaluation of the commercially available software for human health and environmental endpoints with respect to chemical management applications. ECETOC Technical Report No. 89. ISSN-0773-8072-89. 164 pp. Brussels, Belgium: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.

PBBK; ook wel Physiological-based Pharmacokinetic (PBPK) genoemd) richten zich op een mathematische modellering van de lotgevallen van een stof in het lichaam. Hierbij worden gegevens over opname van de stof, distributie, omzetting en uitscheiding geïntegreerd in wiskundige berekeningsmodellen. Gebruik wordt gemaakt van informatie die verkregen is op basis van de fysisch-chemische eigenschappen van de stof, fysiologische parameters zoals bloedstroom, bloeddruk, verdeling bloed tussen de organen alsmede van informatie over blootstelling op celniveau, target weefsels en toxiciteit. PBBK is één van de hoofdthema's in de paradigma verandering in het toxicologische onderzoek waarbij een groot belang wordt toegekend aan mechanistische kennis over toxicologische pathways. Allereerst levert stofs specifieke kennis over biokinetiek, het werkingsmechanisme en de vorming van mogelijke metabole producten in combinatie met onderzoek in weefselkweken extra handvatten voor een adequate extrapolatie en risicobeoordeling van een stof voor de mens<sup>132,133</sup>. Daarnaast kunnen PBBK en PBPK resultaten ook helpen bij de juiste keuze van het te gebruiken onderzoeksmodel in later fasen van het onderzoek.

Computermodellen worden ook gebruikt voor een breed gebied van vragen uit het fundamenteel onderzoek. Voorbeelden hiervan zijn de virtuele neurale netwerken; mathematische modellen waarmee de interactie tussen functionele en/of structurele onderdelen van het centraal zenuwstelsel worden bestudeerd. Een ander voorbeeld is de mathematische modellering in de transmissie van infectieziekten. Veelal dragen deze modelleringstudies meer bij aan de hypothesevorming en het gericht inzetten van dierexperimenten dan dat ze een vervangingsalternatief vormen voor een dierproef.

Computer en mathematische modellering spelen verder een belangrijke rol binnen de systems biology en de bioinformatica. Beide aandachtsgebieden zullen verder op in dit document worden besproken (zie 5.4.7).

### 5.4.4 Slachthuismateriaal

Een aantrekkelijk vervangingsalternatief lijkt het gebruik van slachtafval. Dit is in grote hoeveelheden aanwezig. Toch is toepassing ervan om praktische en wetenschappelijk/ technische redenen beperkt. Zoals gezegd gaat het om slachtafval hetgeen betekent dat het alleen geldt voor een relatief beperkt aantal weefsels en organen van het slachtdier. Verder gaat de kwaliteit van organen en weefsel door het slachtproces en vervoer vrij snel achteruit en is het afkomstig van dieren met een onbekende status. Ten slotte is toepassing veelal beperkt tot vraagstellingen die gericht zijn op locale effecten. Ondanks deze beperkingen in gebruik zijn er voorbeelden van toepassingen, vooral op het terrein van de toxicologie: het gebruik van kippenogen of runderogen als alternatief voor de oog-irritatie test in konijnen<sup>134</sup> f het varkensoor voor onderzoek naar irritatie en huidcorossie<sup>135,136</sup>.

Ontwikkelingen en trends met betrekking tot het gebruik van slachtafval zijn beperkt en, los van incidenteel gebruik, wordt door geïnterviewden niet verwacht dat hierin de komende jaren grote veranderingen zullen plaatsvinden.

---

<sup>132</sup> Blaauboer B.J. (2008). The contribution of toxicity in vitro data in hazard and risk assessment: current limitations and future perspectives. *Toxicol.Lett.* 180(2): 81-84.

<sup>133</sup> Clewell H.J., Andersen M.E., Blaauboer B.J. (2008). On the incorporation of chemical-specific information in risk assessment. *Toxicol.Lett.* 180(2): 100-109.

<sup>134</sup> Prinsen M.K. and Koeter H.B. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem. Toxicology* 31(1): 69-76.

<sup>135</sup> Chilkott R.P., Jenner J., Hotchkiss S.A., Rice P. (2001). In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J.Appl. Toxicol.* 21(4): 279-283

<sup>136</sup> <http://alttox.org/ttrc/toxicity-tests/skin-irritation/>

Een bijzondere vorm van slachtafval is het gebruik van foetaal kalverserum (FCS) als toevoeging voor weefselkweekmedia. FCS wordt gewonnen als 'bijproduct' van het slachtproces, vooral in landen waar runderpopulaties massaal aan het slachthuis worden aangeboden. Ongeboren kalveren van drachtige koeien worden tijdens de slacht verzameld en verbloed, veelal zonder verdoving. Ethische overwegingen en het streven naar gestandaardiseerde kweekmedia (er bestaan verschillen tussen batches FCS) zijn aanleiding geweest om actief onderzoek te doen naar serumvrije media. Dit onderzoek, dat de afgelopen jaren in gang is gezet, zal de komende jaren voortgang vinden. Progressie zal langzaam gaan, omdat voor elke vraagstelling beoordeeld zal moeten worden of serumvrij kweken geen invloed op experimentele resultaten heeft.

### 5.4.5 Menselijke vrijwilligers

Het merendeel van de uitgevoerde diertesten draagt uiteindelijk bij aan de verbetering van de gezondheid van de mens. Hoewel de mens op het eerste gezicht het beste model voor dit onderzoek lijkt, zijn er ethische, praktische en wetenschappelijke beperkingen. Ethische principes voor onderzoek op mensen zijn verankerd in de Declaratie van Helsinki (1964). Deze principes, vastgelegd door de World Medical Association hebben geen wettelijke status maar worden als algemeen geldend beschouwd. Inmiddels is de 6<sup>e</sup> revisie van de Declaratie gepubliceerd (2008)<sup>137</sup>. In tegenstelling tot eerdere versies wordt het uitvoeren van dierexperimenteel onderzoek niet meer als voorwaarde gezien voor onderzoek op mensen kan worden uitgevoerd, maar kunnen gegevens ook afkomstig zijn van onderzoek in alternatieve modellen. Daarnaast dienen studies in mensen te worden getoetst door medisch-ethische commissies en geldt het principe van informed consent<sup>138</sup> ..

'Medical research involving human subjects must conform to generally accepted scientific principles, be based on a thorough knowledge of the scientific literature, other relevant sources of information, and adequate laboratory and, as appropriate, animal experimentation. The welfare of animals used for research must be respected.'  
(art. 12 Declaration of Helsinki, *Ethical Principles for Medical Research involving Human Subjects*, 2008).

Internationaal aanvaarde ethische richtlijnen voor wetenschappelijk onderzoek met mensen zijn ook vastgelegd door de Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS)<sup>139</sup>.

Praktische beperkingen hebben veelal te maken met de moeilijkheidsgraad van het organiseren van onderzoek in mensen. Wetenschappelijke beperkingen, ten slotte, zijn gerelateerd aan de diversiteit en complexiteit in achtergrond van mensen die in het onderzoek participeren en waarvan de invloed op experimentele resultaten niet bij voorhand duidelijk is. Deze beperkingen laten onverlet dat onderzoek op menselijke vrijwilligers een bijdrage levert aan het vervangen van proefdieren. Daarbij wordt onderzoek op mensen als onderdeel van het klinisch onderzoek in de

---

\* Microdosering is een benadering die zich niet beperkt tot onderzoek in mensen maar die ook kan worden toegepast in dierproeven.

<sup>137</sup> <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>

<sup>138</sup> Informed consent is de vrijwillig verkregen toestemming van een persoon of vrijwillige voor deelname aan een studie. Informatie moet zijn gegeven over doel, methode, procedure van de studie, de voordelen en de risico's en over de graad van onzekerheid over de uitkomst ([http://www.minerva-ebm.be/articles/nl/woordenlijst/informed\\_consent.htm](http://www.minerva-ebm.be/articles/nl/woordenlijst/informed_consent.htm))

<sup>139</sup> CIOMS (2002). *International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects*. [http://www.cioms.ch/frame\\_guidelines\\_nov\\_2002.htm](http://www.cioms.ch/frame_guidelines_nov_2002.htm)

ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen niet als een vorm van vervanging beschouwd. Wel geldt dit voor proefpersonen in de veiligheidsevaluatie van cosmetica, waarbij het kader van de Declaratie van Helsinki zijn gewaarborgd door vooronderzoek met behulp van fysisch-chemische en *in vitro* methoden. Andere gebieden in het proefdiergebruik waarbij de mens als alternatief kan fungeren zijn het onderwijs en het fundamenteel onderzoek. Grote veranderingen op deze terreinen worden niet verwacht.

Een nieuwe ontwikkeling met betrekking tot onderzoek in proefpersonen is microdosering\* ten behoeve van farmacologisch onderzoek. Bij microdosering wordt een zodanig lage dosering (microgrammen) van een stof toegediend dat er geen bijwerkingen verwacht worden. Microdosering vindt vooral toepassing binnen het farmacologisch onderzoek en is er op gericht om in een vroeg (preklinische) stadium van de ontwikkeling de farmacokinetiek en distributie van het potentiële geneesmiddel in de mens in kaart te brengen<sup>140</sup>. Vaak wordt hierbij 1/100 van de farmacologische dosis toegediend. Gebruik wordt gemaakt van zeer gevoelige meetmethoden als massaspectrometrie<sup>141</sup> (accelerator mass spectrometry = AMS). Hoewel microdosering het gebruik van proefdieren niet overbodig zal maken (microdosering wordt gebaseerd op veiligheidsinformatie verkregen in proefdieren) kan het bijdragen aan het gericht inzetten van dierexperimenten en het verminderen in het proefdiergebruik. In 2005 is door de Europese Commissie vanuit het Kaderprogramma het project EUMAPP (European Union Microdose AMS Partnership Programme) gestart, gericht op het ontwikkelen van toepassingsvormen van microdosering<sup>142</sup>. Richtlijnen voor de toepassing van micro-dosering zijn te vinden in een position paper van EMEA<sup>143</sup>

### 5.4.6 Genomics technologieën

Wat monoclonale antistoffen in de jaren zeventig waren en genetische modificatie in de jaren negentig zijn de omics technologieën in het eerste decennium van deze eeuw; een technologie met een oneindig aantal toepassingen en daarom in het centrum van de wetenschappelijke aandacht. Zo levert het invoeren van de zoekterm van 'genomics' in PubMed een totaal van 54.514 hits op, waarbij meer dan 5500 artikelen uit 2009 (datum search eind november 2009). Het overzicht van de literatuur laat ook zien dat genomics in vrijwel alle disciplines van het onderzoek toepassing vinden. In de interviews en enquête komen omics technologieën onveranderlijk naar voren als technologie die grote invloed zal hebben op het onderzoek in zijn algemeenheid en dierproeven in het bijzonder.

Genomics technologieën zijn gebaseerd op de toepassing van high throughput moleculair biologische technieken die het mogelijk maken complexe processen op het kleinst mogelijke functionele en moleculaire niveau te bestuderen en in kaart brengen. In het bijzonder kan daarbij gedacht worden aan processen op gen niveau of eiwit niveau. In dit verband wordt vaak het begrip 'Genomics' gebruikt. In

---

\* Microdosering is een benadering die zich niet beperkt tot onderzoek in mensen maar die ook kan worden toegepast in dierproeven.

<sup>140</sup> Singh SS. (2006). Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Curr. Drug. Metab* 7(2): 165-182

<sup>141</sup> Lappin G. & Garner C. (2005). The use of accelerator mass spectrometry to obtain early human ADME/PK data *G Expert Opinion in Drug Metabolism and Toxicology* (2005) 1(1):23-31

<sup>142</sup> EUMAPP, European Union Microdose AMS Partnership Programme backgroundpaper, januari 2008

<sup>143</sup> EMEA (2004). Committee for medicinal products for human use. Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose

algemene zin wordt onder Genomics verstaan: de studie naar genetisch materiaal van levende organismen en hoe genetische informatie in dit genetisch materiaal wordt vertaald naar het functioneren in de cel, weefsels, organen en organismen binnen populaties, soorten en tussen soorten in hun omgeving<sup>144</sup>. In zijn meest beperkte definitie is genomics de bestudering van de functies van het genoom zelf en de interactie tussen de genen van het genoom (epistasie). Daarmee verschilt genomics van de genetica waarin de functie van een enkel gen centraal staat.

De vertaling van genetische informatie naar functies van cel, organisme en weefsels, vindt plaats op verschillende omics-niveaus: genomics in engere zin (focus op het gen), transcriptomics (de bestudering van mRNA in de cel dat duidt op een bepaalde transcriptie van het genoom), proteomics (de vertaling van het genoom naar eiwitten in de cel en de bestudering van de functies van deze eiwitten) of metabolomics (de vorming van chemische fingerprints van metabolieten die duiden op bepaalde cellulaire processen).

Een belangrijk hulpmiddel binnen het genomics onderzoek zijn microarray technieken, voor het eerst beschreven in 1987<sup>145</sup>. Microarrays zijn kleine plaatjes (silicone chips of glasplaatjes) waarop genetisch materiaal (DNA) kan worden gehecht, in principe tot tienduizenden genen per plaatje. Door middel van moleculair biologische technieken en kleuringmethoden is zichtbaar te maken of deze genen zijn geactiveerd of juist gedown gereguleerd. Deze techniek heeft vele toepassingen. Binnen het diagnostisch onderzoek kan de microarray worden gebruikt voor de typering van een tumor door DNA of RNA van het tumor weefsel te vergelijken met referentie DNA in een tumor biobanken. Een van de eerste toepassingen op dit gebied was een microarray voor de diagnostiek van bepaalde borsttumoren door het NKI<sup>146</sup>. In het onderzoek wordt micro-array vooral gebruikt om het effect van een behandeling of blootstelling op gen(expressie) niveau te bestuderen. Daarbij wordt het DNA/RNA van onbehandeld weefsel of cellen als negatieve controle gebruikt.

Centraal bij proteomics staat het identificeren en kwantificeren van cellulaire eiwitten (structural proteomics) of het verkrijgen van inzicht in de functies van deze eiwitten (functional proteomics) en bij metabo(lo)nomics het verkrijgen van inzicht in gevormde metabolieten. Technieken die hiervoor in het bijzonder worden gebruikt zijn gel electroforese, modificaties van SDS-PAGE en massa spectroscopie.

De complexiteit van cellulaire systemen is enorm en lijkt naar mate men meer weet, in complexiteit toe te nemen. De 'klassieke' hypothese dat één gen wordt overgeschreven door één RNA en dat dit RNA één eiwit maakt, is inmiddels naar de prullenbak verwezen. Nu weet men dat één gen overgeschreven wordt door soms wel 10 verschillende RNA's en per RNA tot wel 100 verschillende eiwitten kunnen worden geproduceerd. Daarnaast geldt dat één eiwit weer verschillende functies kan hebben in verschillende biologische pathways. Vanwege deze enorme complexiteit speelt bioinformatica een essentiële rol bij de interpretatie van gegevens over het genoom, de transcriptie, en de functie en samenstelling van eiwitten en metabolieten. Bioinformatica maakt gebruik van computer software en geavanceerde berekeningsmodellen om de enorme hoeveelheid data te bewerken die met omics onderzoek verkregen wordt en om statistische verbanden te leggen tussen

---

<sup>144</sup> Zwart, H. (2005) "Wat is genomics? Een filosofische profielschets". *Filosofie & Praktijk* **26**(1): 28-37.

<sup>145</sup> Kulesh DH, Clive DR, Zarlenga DS, Greene JJ (1987). Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences". *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (23): 8453-8457

<sup>146</sup> Van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ et al., *A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.

behandeling en omics resultaten, zoals patroonherkenning in genexpressieprofielen die gerelateerd zijn aan specifieke tumorinductie.

Zoals reeds aangegeven kent het genomics onderzoek inmiddels vele toepassingen; binnen het fundamenteel onderzoek om cellulaire processen in kaart te brengen en cellulair mechanistisch onderzoek te doen, binnen het medisch onderzoek voor de diagnostiek en voor de bestudering van pathofysiologische processen, binnen de microbiologie om de interactie te bestuderen tussen micro-organisme en gastheer, binnen het farmacologisch onderzoek met betrekking tot de interactie tussen (potentiële) geneesmiddelen en cellulaire processen, binnen het toxicologisch onderzoek om mechanismen achter toxiciteit vast te stellen of om vroege biomarkers voor toxiciteit te identificeren, maar in de gedragsbiologie ook om inzicht te krijgen in de biologische oorsprong van bepaald gedrag<sup>147</sup>.

Het grote belang dat aan genomics onderzoek wordt toegekend heeft zich vertaald in beschikbare budgetten voor dit onderzoek. Een volledig verzicht is niet voorhanden. Indicatief echter zijn de toegekende budgetten voor het Netherlands Genomics Initiative (NGI) en vanuit de EU. Informatie hierover wordt gegeven in Bijlage 4.

Voor wat betreft Toxicogenomics, een van de belangrijke toepassingsgebieden van de genomics bestaan in het veld twee mogelijke benaderingen die een 3V effect kunnen sorteren: een statistische benadering en een mechanistische benadering.

De mechanistische gaat uit van de moleculaire pathways achter een toxisch effect. Zo wil men, wanneer bepaalde transcriptie factoren op een toxisch effect wijzen, weten welke functies deze transcriptiefactoren op celniveau hebben. Bij de statistische benadering wordt het genexpressie patroon van een te onderzoeken stof vergeleken met die van stoffen waarvan op basis van humane studies, in vivo en/of in vitro assays alles bekend is over het toxiciteitsprofiel. Voorspelling van het toxiciteitsprofiel van de te onderzoeken stof vindt plaats op basis van overeenkomsten in expressie profielen. Men noemt deze statistische benadering ook wel de black box benadering omdat alle genomics responsen in kaart worden gebracht, dus ook de genen waarvan de exacte functie niet bekend is, waardoor onduidelijk blijft hoe de pathways voor toxiciteit zijn.

Sommigen geïnterviewden zien wetenschappelijke mogelijkheden in beide benaderingen. Echter zij verwachten dat de industrie en regelgevers meer zien in de mechanistische benadering omdat dit meer zekerheid geeft. Fundamentele kritiek op de mogelijke bijdrage van genomics aan een mechanistische benadering komt ook voor en deze kritiek is vooral gerelateerd aan de enorme complexiteit op omics niveau. Eén gen kan afgelezen worden door 10 verschillende Ra's waar per RNA 100 verschillende eiwitten mee worden geproduceerd. Daarnaast is er nog veel onbekend over de werking van het humane genoom waarin steeds meer lagen ontdekt worden in functionaliteit en transcriptie van het genoom. Illustratief is de ontdekking van het cantilenes RNA. Zo 'n vier jaar geleden is men er achter gekomen dat het DNA hele kleine stukjes cantilenes RNA afscheidt die kunnen binden met messengerRNA (mRNA). Door binding van het antisense RNA aan het mRNA wordt de transcriptie van mRNA naar eiwitten geremd.

Is de praktische toepassing van de mechanistische benadering nog ver weg, de acceptatie van een statistische benadering wordt door het veld eerder mogelijk geacht. Een soortgelijke benadering wordt al gebruikt bij de diagnostiek van borsttumoren (Vijver et al. 2002, zie begin 5.4.7)..

Tegen het perspectief van de 3Vs hebben de Genomics vele gezichten. Sommigen geïnterviewden geven aan dat genomics onderzoek zal leiden tot een verhoging in het proefdiergebruik. De achterliggende gedachte is dat dit onderzoek vooral gericht is op cellulaire mechanismen, en het identificeren van mogelijke genetische basis daarvoor. Dit zou initieel kunnen leiden tot meer vragen waarbij voor de

---

<sup>147</sup> Buitenhuis, A.J., et al., (2004). Identification of QTLs Involved in Open-Field Behavior in Young and Adult Laying Hens. *Behavior Genetics* **34**(3): 325-333

beantwoording onder andere gebruik zal worden gemaakt van diermodellen waaronder genetisch gemodificeerde dieren. Als gevolg hiervan zou weliswaar het relatieve aandeel van dierproeven in de beantwoording van onderzoeksvragen afnemen maar, doordat er uiteindelijk meer onderzoeksvragen komen, het totaal aan dierproeven omhoog zou omhoog kunnen gaan. Verder wordt de reductionistische benadering in het genomics onderzoek gezien als ethisch problematisch omdat dit zal leiden tot een geringere morele betrokkenheid bij en geringere kennis over het proefdier in dierexperimenteel onderzoek. Velen echter zijn optimistischer over de bijdrage van genomics aan de 3Vs. Een stijging in het gebruik van proefdieren wordt als tijdelijk gezien en als 'investering' in de toekomst. Meer kennis over werkingsmechanismen, zo is de gedachte, zal onze kennis over werkingsmechanismen vergroten en daardoor meer mogelijkheden bieden voor de ontwikkeling van vervangings- of verminderingsalternatieven<sup>148,149</sup>. De volgende paragraaf zal ingaan op de diverse 3V mogelijkheden.

*Verfijning.* Genomics biedt de mogelijkheid tot het ontwikkelen van vroege biomarkers. Zo zou genomics in geval van screening van stoffen op kankerverwekkende eigenschappen in een vroeg stadium informatie kunnen geven over verhoogde expressie van 'kankergenen' of down regulatie van DNA herstel genen. Deze vroege biomarkers zouden het mogelijk maken om ruim voor het ontstaan van belastende tumoren het experiment te beëindigen. Een verder voordeel is dat de gevoeligheid van genomics technologieën het mogelijk moet maken om met microdoseringen te werken waardoor dieren minder ongerief zullen ondervinden. Ten slotte kan door middel van genomics mechanistische informatie verkregen worden over pijn en pijn perceptie<sup>150</sup>. Ter nuancering van bovenstaande moet ook genoemd worden dat omics onderzoek ook tot een verhoging van ongerief kan leiden ondermeer door het initiëren van meer belastend onderzoek of het afnemen van weefsels and lichaamsvloeistoffen voor omics onderzoek.

*Vermindering.* Genomics kan op verschillende manieren bijdragen aan een reductie in het proefdiergebruik: door een gerichte selectie van het meest relevante diermodel (comparative genomics) voor een specifieke onderzoeksvraag, als screeningsmethode in een tiered testing approach en als vroege en gevoelige biomarker. Daarnaast kan door genomics verkregen informatie over werkingsmechanismen bijdragen aan een verbeterde experimentele opzet en de mogelijkheid het aantal dieren per groep te verminderen. Ten slotte kan het onder bepaalde omstandigheden mogelijk zijn om het dier zijn eigen controle te laten zijn waardoor controle groepen verminderd kunnen worden.

*Vervanging.* Genomics is een technologie en geen onderzoeksmodel. Genomics op zich kan dan ook geen dierproef vervangen. Maar gebruikt in combinatie met in *vitro* methoden kan genomics het belang van deze in *vitro* modellen voor het onderzoek verhogen. Het toenemende belang van genomics in samenhang met in *vitro* methoden blijkt bij invoeren van de trefwoorden 'genomics' en 'in vitro' in PubMed. Voor 1999 leverde dit 6 publicaties op, voor 2009 (tot december 2009) waren dit ruim 300 hits, een aantal vergelijkbaar met het aantal hits voor 'genomics' en 'in vivo'. Genomics heeft een toegevoegde waarde voor in *vitro* onderzoek door (cellulaire) mechanismen zichtbaar te maken en extrapolatie een breder fundament

---

<sup>148</sup> Bugrim A., Nikolskaya T, Nikolsky Y (2004). Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. *Drug Discovery Today*, 9(3): 127-135.

<sup>149</sup> Hendriksen C (2005). Preface. In: *Genomics & Alternatives to Animal Use. Netherlands Genomics Initiative*, The Hague, The Netherlands. pp.10-11.

<sup>150</sup> Heindl-Erdmann C, Axmann R, Kreitz S et al. (2009). Combining functional magnetic resonance imaging with mouse genomics: new options in pain research. *Neuroreport*

te geven. De relevantie van de *in vitro* modellen zou verder verbeterd kunnen worden door gebruik van stamcellen of menselijke weefsels. Een andere optie voor vervanging kan liggen in het gebruik van genomics in preklinisch onderzoek in combinatie met microdosering in de mens. Effecten van stoffen in de mens zouden hierbij gemeten kunnen worden op de genexpressie niveau.

### 5.4.7 Systeembioogie (Systems biology)

Is in de voorgaande onderdelen van Hoofdstuk 5. aandacht besteed aan nieuwe innovatieve ontwikkelingen op het gebied van weefselkweken, computationele benaderingen en genomics technieken. Door deze ontwikkelingen zijn we in staat om de bouwstenen van biologische systemen te bestuderen; in het bijzonder genen, eiwitten en metabolieten, maar ook neuronale netwerken, signaaltransductie e.d. Het op een holistische manier in kaart brengen en integreren van al deze elementen en het bestuderen van de dynamische interactie daartussen wordt ook wel aangeduid met Systeembioogie of systems biology. De aandacht voor systeem biologie is de laatste jaren sterk toegenomen. Invoeren van de zoekterm Systems biology in PubMed levert een totaal aantal van circa 35628 hits op van meer dan 4000 voor 2009 (tot december 2009).

Bij uitstek draagt systems biology een multi-disciplinaire karakter waarbij samenwerking vereist is tussen biologen, chemici, natuurkundigen, wiskundigen, informatici en medici. Eind 2008 is door NWO een actieplan opgesteld om vorm te geven aan een nationaal programma voor systeembioogie. De beoogde nationale inspanning richt zich op drie toepassingsterreinen: agro/voeding, farmaceutica en bioprocestechnologie. In 2008 is door de Commissie Breimer van NWO een voorstel gedaan voor het opzetten van centres of excellence. Inmiddels heeft NWO het programma Centres for Systems Biology Research (CSBR) ingesteld<sup>151</sup>. Andere voorbeelden van activiteiten op het gebied van systeem biologie is de afdeling voor systeem biologie bij TNO en de afdeling BioModeling en BioInformatics bij de Technische Universiteit Eindhoven. Deze laatste afdeling doet bijvoorbeeld onderzoek naar celsignaal netwerken en voor bot remodelingsprocessen. In Amerika bevinden zich centra voor systeem biologie bij de grote universiteiten zoals Harvard, MIT en in Seattle Institute of Systems Biology'. Vooralsnog staat systeem biologie in de kinderschoenen en wordt bij resultaten veelal verwezen naar een beperkte integratie van technieken en data/sets en naar resultaten vooral op het terrein van vroege biomarkers voor ziekteprocessen<sup>152</sup>. Wat de systeem biologie uiteindelijk voor het proefdiergebruik zal betekenen is nog volstrekt onduidelijk. Voor de korte termijn mag verwacht worden dat een deel van de informatie die nodig is verkregen zal worden uit dierexperimenteel onderzoek. Op termijn (>2020) mag verwacht worden dat systeem biologie dierexperimenteel onderzoek zal kunnen beperken en zelfs voorkomen.

### 5.4.8 Weefselkweek

Weefselkweektechnieken zijn technieken waarbij cellen of weefsels *in vitro* gebruikt worden voor onderzoek. Daarbij kan het gaan om celsystemen die een laag beslaan (monolayerculturen), celsystemen met meerdere type cellen, cel systemen die in 3D structuren groeien en om weefsel "slices" .

---

<sup>151</sup> [http://www.nwo.nl/NWOHome.nsf/pages/NWOA\\_7UZGKF](http://www.nwo.nl/NWOHome.nsf/pages/NWOA_7UZGKF)

<sup>152</sup> Van der Greef J, Martin S, Juhasz P. et al. (2007). The art and practice of systems biology in medicine: mapping patterns of relationships. J. Proteome Res 6(4): 1540-1559.

Naast het feit dat cel kweekmethoden in staat zijn om het gebruik van dierproeven sterk te verminderen, is een groot voordeel van deze methoden dat de omstandigheden beter gestandaardiseerd kunnen worden dan in een dierproef. Het aantal variabelen dat van invloed kan zijn op een onderzoek is veel kleiner, omdat het systeem minder complex is.<sup>153</sup> De lagere complexiteit van testsystemen in weefselkweekmethoden is direct ook het belangrijkste nadeel van weefselkweekmethoden. Cellen zijn eenheden die reageren op grote hoeveelheden stimuli uit hun omgeving, het organisme, die moeilijk *in vitro* nagebootst kunnen worden.<sup>154</sup> Meestal kunnen weefselkweek methoden dan ook niet gezien worden als een volledige vervanging van een dierproef. Slechts een beperkt aspect van de werking van een medicijn, toxische stof of biologisch proces kan in een weefsel of cel bekeken worden. Vaak worden weefselkweekmethoden dan ook gebruikt in teststrategieën, zoals Tiered test approaches waarin meerdere technieken van belang zijn. Men verwacht door middel van genomics technieken en systeembioogie een groter begrip te krijgen van de mechanismen achter de processen die men in *in vitro* systemen kan bestuderen en zo steeds beter in staat te zijn om resultaten te kunnen extrapoleren naar het gehele organisme. Een ander voordeel van met name cellen, is dat het makkelijker is om deze genetisch te modificeren dan proefdieren, overigens wel met de aantekening dat de modificatie nooit 100% is. Ten slotte kan door het gebruik van *in vitro* testsystemen met humaan weefsel een deel van de onzekerheid weggenomen worden met betrekking tot de extrapolatie van resultaten van proefdier naar de mens<sup>155, 156</sup>. Een toenemend gebruik van humaan weefsel wordt door veel geïnterviewden als een belangrijke ontwikkeling gezien in het vergroten van het belang van *in vitro* onderzoek.

Weefselkweek methoden kunnen voor uiteenlopende doelstellingen worden gebruikt. Zo worden humane weefsels in het toxicologisch en farmacologisch onderzoek gebruikt voor het voorspellen van farmacokinetische\* eigenschappen van stoffen, voor het selecteren van de juiste diermodellen en voor het voorspellen van orgaanspecifieke toxiciteit<sup>157</sup>. Daarnaast kunnen weefsels gebruikt worden voor het achterhalen van mechanismen van ziekteprocessen. Hieronder zullen een aantal weefselkweekmethoden worden bekeken: namelijk cellijnen met in het bijzonder het potentieel van stamcellen, 3D kweektechnieken en orgaanculturen

### Cellijnen

Er zijn verschillende celsystemen bruikbaar als 3V alternatief. Daarbij kunnen zowel dierlijke cellen als menselijke cellen een rol spelen. Humane cellen hebben ten opzichte van dierlijke cellen het voordeel dat deze de extrapolatie naar de mens vergemakkelijken. Echter humane cellen zijn in veel gevallen slechts beperkt beschikbaar.

---

<sup>153</sup> Pfaller, W., M. Balls, et al. (2001). "Novel Advanced *In vitro* Methods for Longterm Toxicity Testing." ATLA 29: 393-426

<sup>154</sup> Bhogal N., Grindon C., Combes R., Balls M., Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies *Trends in Biotechnology* (2005) Vol.23 No.6

<sup>155</sup> MacGregor, J.T. Collins, J.M., Sugiyama Y., Tyson, C.A., Dean J., Smith, L., Andersern, M., Curren, R.D. Houston, B., Kadlubar, F.F., Kedderis, G.L., Krishnan, K., Li A.P., Parchment R. E., Thummel K., Tomaszewski, J.E., Ulrich, R., Vickers, A.E.M., Wrighton, S.A., (2001) FORUM: *In Vitro* Human Tissue Models in Risk Assessment: Report of a Consensus-Building Workshop, *Toxicological Sciences* 59, 17-36

<sup>156</sup> Coleman RA. (2009). Drug discovery and development tomorrow – changing the mindset. ATLA, Suppl.1, 1-4.

\* Met farmacokinetiek wordt het lot van de werkzame stof in het lichaam bedoeld. Daarbij gaat het om de Absorptie van toedieningsplaats naar bloedbaan, om de Distributie van de stof door het lichaam, het Metabolisme dus de chemische omzetting van de stof in metabolieten en Excretie van de stof uit het lichaam. Deze eigenschappen worden ook wel de ADME eigenschappen genoemd

<sup>157</sup> Kettenhoven, R. Bohlen, H. (2008) Preclinical assessment of cardiac toxicity. *Drug Discovery Today* 13 no. 15/16 p. 702-707.

De meest simpele systemen bestaan uit primaire celculturen. Indien afkomstig van het dier worden deze cellen worden vers van een proefdier verkregen en behoren derhalve tot de categorie van relatieve vervanging: weliswaar een substantiële reductie in proefdiergebruik maar geen volledige vervanging. Een voordeel van het gebruik van primaire cellen is dat zij in een gedifferentieerde staat leven en dezelfde functionaliteit hebben als cellen in het organisme. Helaas behouden de cellen deze functionaliteit slechts tijdelijk en verliezen zij na verloop van tijd hun gedifferentieerde staat. Een ander nadeel is dat deze cellen niet of slechts beperkt in staat zijn om zich te delen.<sup>144</sup>

Cellijnen hebben het voordeel dat zij wel langdurig in leven gehouden kunnen worden doordat zij in staat zijn oneindig te delen. Bij cellijnen gaat het bijvoorbeeld om tumorcellen (zoals de HeLa cell of de Vero cel), cellen waar een genetische verandering is aangebracht of adulte en embryonale stamcellen. Stamcellen zijn in staat om zich, onder invloed van specifieke prikkels, te differentiëren naar verschillende celtypen<sup>158,159,160</sup>.

Vooraf cellijnen die zich onbeperkt kunnen delen en pluripotent\* zijn, worden interessant gevonden. Deze hebben namelijk de potentie om een oneindige voorraad te vormen van verschillende typen cellen. Dit is, vooral wanneer gezocht wordt naar *in vitro* systemen met humaan weefsel waarbij zoals gezegd de beperkte beschikbaarheid problematisch kan zijn, een aantrekkelijk perspectief. Embryonale stamcellen bezitten deze eigenschappen. Echter een nadeel van humane embryonale stamcellen is dat het gebruik hiervan voor onderzoek internationaal aan strenge regels is gebonden. Dit maakt het moeilijk om nieuwe lijnen te maken, maar ook om met al bestaande lijnen te werken. Perfectionering van technologieën die cellen kunstmatig onsterfelijk zouden kunnen maken zonder dat afwijkingen in het chromosoom ontstaan, zou dit probleem mogelijk kunnen opheffen. Als gevolg van de strenge wetgeving zijn namelijk veel pogingen gedaan om pluripotente cellen op alternatieve manieren te verkrijgen. Zo kan men uit dode embryo's levende cellen halen of met behulp van een biopsie, zonder het embryo te doden, embryonale stamcellen uit levende embryo's extraheren. Daarnaast kan de celkern van een volgroeide cel overgebracht worden in een eicel zonder celkern waardoor deze pluripotent wordt. Aan deze techniek kleven echter ook ethische dilemma's omdat dit gelijk staat aan kloneren. Verder kunnen onbevuchte eicellen gestimuleerd worden om zich te delen. Door dit proces ook wel, parthenogenetische ontwikkeling<sup>161</sup> genoemd, ontstaan cellen die soortgelijke (zij het niet alle) eigenschappen vertonen met embryonale stamcellen<sup>162</sup>. De meest recente en meest veelbelovende ontwikkeling van het kunstmatig maken van onsterfelijke cellen zijn induced pluripotent stem cells<sup>163</sup>. Geïnduceerde somatische cellen zijn gewone, somatische lichaamscellen die worden teruggebracht tot een pluripotente staat. Dit kan door met

---

<sup>158</sup> Wright, W.E. Piatyszek, M.A. Rainey, W.E. Byrd, W. Shay, J.W. (1996) Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Developmental Genetics* **18** p. 173-179

<sup>159</sup> Solter, D. (2006) From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nature* **7** p.319- 327

<sup>160</sup> Dreesen O., Brivanlou A.H., Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells, *Stem Cell Rev* (2007) 3:7-17

\* Er worden verschillende gradaties in differentiatie potentieel onderscheiden; *Totipotent*: wanneer ingebracht in de baarmoeder kan de cel een heel organisme te vormen, inclusief vruchtvlies en placenta (bij zoogdieren); *Pluripotent*: de cel kan zich differentiëren naar alle celtypen van een organisme; *Multipotent*: de cel kan zich differentiëren naar alle celtypes afkomstig uit één embryonale kiemlaag (endoderm, ectoderm en mesoderm). In sommige gevallen kunnen multipotente stamcellen *in vitro* worden aangezet tot differentiatie naar een andere kiemlaag.

<sup>161</sup> Parthenogenese: ontwikkeling van een individu uit een onbevuchte eicel

<sup>162</sup> Rao, M. Condic, M.L. (2008) Alternative Sources of Pluripotent Stem Cells: Scientific Solutions to an Ethical Dilemma. *Stem Cells and Development* **17** p.1-10.

<sup>163</sup> Yamanaka, S, A fresh look at Ips cells, *Cell*, 2009, vol.137 iss.1 pg.13

behulp van een lentivirale vector\*\* dezelfde genen te activeren die ook tot expressie komen in embryonale stamcellen. Van iPS-cellen wordt geclaimd dat ze *in vitro* kunnen worden aangezet tot differentiatie tot alle mogelijke celtypen.

Andere cellen waar minder ethische bezwaren aan kleven, zijn adulte stamcellen of weefselstamcellen. Dit zijn cellen die zorgen voor het herstel van alle typen weefsels in het lichaam. Echter het werven van adulte stamcellen is lastig. Adulte stamcellen moeten door invasieve ingrepen gewonnen worden uit volgroeide weefsels van patiënten of vrijwilligers. Daarnaast zijn ze lastig te vinden in het weefsel en zijn zij multipotent en dus beperkter in de mate waarop zij kunnen differentiëren naar verschillende typen weefsels dan embryonale stamcellen<sup>164</sup>. Stamcellijnen verkregen uit menselijke placenta's Placenta Derived Multipotent Cells (PDMC) zijn makkelijker te vergaren en hebben mogelijk een groter differentiatiepotentieel ten opzichte van adulte stamcellen<sup>165</sup>. Men heeft tot nu toe aan weten te tonen dat ze kunnen differentiëren tot vetweefsel, botweefsel en neuronaal weefsel. PDMC's kunnen gebruikt worden voor *in vitro* studies bij toxicologisch onderzoek<sup>166</sup>.

Respondenten zien veel potentie in het gebruik van stamcellen als vervangings- of verminderingsalternatief voornamelijk binnen de toxicologie of het veiligheidsonderzoek, maar ook in het fundamenteel onderzoek. In het bijzonder het gebruik van stamcellen voor onderzoek naar levertoxiciteit, cardiotoxiciteit en neurotoxiciteit zou een vermindering van het gebruik van dierproeven kunnen betekenen. Voordat stamcellen hiervoor toepasbaar zijn, moet er nog veel onderzoek worden gedaan. Zo is het nu nog lastig om homogene culturen te maken, om celculturen uit stamcellen stabiel te houden, om mogelijke mutaties te voorkomen en volledig volwassen gedifferentieerde cellen te maken. Wel is er al een toxiciteitstest met embryonale stamcellen gevalideerd door ECVAM. Dit gaat om een embryotoxiciteitstest waarvoor embryonale stamcellen van muizen worden gebruikt<sup>167</sup>.

### Co-culturen en 3D celstructuren

Afhankelijk van het celtype, kunnen primaire cellen in kweek gebracht worden in monoculturen met maar één celtype of in co-culturen waarbij er meerdere celtypen in een *in vitro* systeem groeien. Bij co-culturen kunnen de interacties tussen cellen bestudeerd worden. Men is steeds beter in staat om meerdere typen primaire cellen in kweek te brengen.

Daarnaast neemt het belang toe van 3D celculturen waarbij cellen (één celtype of een co-cultuur van meerdere celtypen) in ruimtelijke structuren groeien waarbij getracht wordt de structuur van een normaal weefsel te benaderen. Dit doet men door een zogenaamde scaffolds, vrij vertaald stellages, te maken van polymeren. Scaffolds kunnen bijvoorbeeld de vorm hebben van een vat. In het ideale geval is de scaffold biologisch afbreekbaar en houdt de celcultuur zijn vorm in stand doordat het zijn eigen extra cellular matrix gevormd heeft (ECM).<sup>168</sup> Deze techniek kan niet alleen interacties tussen verschillende cellen mogelijk maken, maar kan ook

---

\*\* Dit is een virus dat DNA kan inbouwen in het genoom van een niet-delende cel. Het HIV virus heeft bijvoorbeeld deze eigenschap

<sup>164</sup> Blau, H.M. Brazelton, T.R. Weimann, J.M. (2001) The evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell* 105 p. 829-841

<sup>165</sup> Yen, B.L., Huang, H.I., Chien, C-C. Jui, H-Y. Ko, B-S. Yao, M. Shun, C-T., Yen, M-L. Lee, M-C. Chen, Y-C. (2005) Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. *Stem Cells* 25, p.3-9

<sup>166</sup> Davila, J.C. Cezar, G.G. Thiede, M. Strom, S. Miki, T. Trosko, J. Use and Application of Stem Cells in Toxicology. *Toxicological Sciences* 79 p. 214-223.

<sup>167</sup> <http://ecvam.jrc.it/> toegang 10 december

<sup>168</sup> McKee, J. A. Banik, S.S.R., Boyer, M.J., Hamad, N.M., Lawson, J.H., Human arteries engineered in vitro, *EMBO reports* 4 (6 ) 2003

bijvoorbeeld de groei van een tumor beter nabootsen<sup>169</sup>. Een andere toepassing is een in vitro huidmodel voor het bestuderen van huidcorrosie en huidirritatie.<sup>170</sup> Experts zijn voorzichtig wat betreft de toepassing van in vitro 3D celstructuren. Huid of bloedvaten gemaakt van tissue-engineering zijn nog steeds veel minder complex dan weefsels zoals die in het organisme voorkomen en kunnen echte weefsels, in het bijzonder de meer complexere weefsels, vooralsnog maar beperkt modelleren.

### Orgaanculturen

Orgaanculturen maken het mogelijk nog complexere interacties in vitro te bestuderen. Ze dragen bij aan een vermindering en vervanging van dierproeven. De techniek van orgaanculturen bestaat uit het weghalen met een soort boor van kleine stukjes weefsel uit een orgaan. Meestal komt het weefsel van muis, rat en het minivarken. Daarnaast wordt ook in toenemende mate weefsel van menselijke donoren gebruikt. Van dit weefsel worden dunne plakjes gemaakt. De plakjes (slices) zijn ongeveer 10 cellagen dik. Door deze in een medium te plaatsen kunnen de weefsels tot 4 dagen in leven gehouden worden. Men werkt voornamelijk met leverslices. Dit omdat de lever een belangrijk orgaan is bij de afbraak van geneesmiddelen. Daarnaast wordt steeds meer met materiaal uit longen, nieren en darmen gewerkt<sup>171</sup>. Vooral slices van de darm worden steeds vaker gebruikt om te kijken naar farmacologische en farmacokinetische effecten van geneesmiddelen omdat de relevantie van de darm voor het metabolisme van geneesmiddelen de laatste jaren duidelijk is geworden<sup>172</sup>. Net als bij cellijnen van primaire cellen uit proefdieren hoeven er relatief weinig dieren opgeofferd te worden. Bijvoorbeeld van een rattenlever kunnen honderd slices gemaakt worden, waarmee met een dier verschillende doses van meerdere stoffen over verschillende tijdsperiodes getest kunnen worden.

Met behulp van slices kunnen de farmacokinetische eigenschappen van stoffen (bijv. metabolisme en opname in het lichaam door de darm) bestudeerd worden. Ten tweede worden slices gebruikt om te kijken naar de effectiviteit en mogelijk toxische eigenschappen van medicijnen voordat deze getest worden op proefdieren<sup>173</sup>. De aanwezigheid van alle celtypen in de lever is hierbij een groot voordeel, want toxiciteit veroorzaakt door lichaamsvreemde stoffen is vaak een multicellulair proces. Daarnaast kunnen slices gebruikt worden om ziekteprocessen zoals fibrose te bestuderen. In slices kan gekeken worden naar factoren die fibrose induceren en naar de effecten van potentiële medicijnen tegen fibrose<sup>174</sup>. Verder worden orgaanslices gebruikt voor onderzoek naar koude ischemie. Koude ischemie is het effect van zuurstofloze periode door gebrek aan bloedtoevoer op organen die gebruikt worden voor transplantatie<sup>175,176</sup>

---

<sup>169</sup> Prestwich, G.D., Liu, Y, Yu, B., Shu, X.Z., Scott A. 3-D culture in synthetic extracellular matrices: New tissue models for drug toxicology and cancer drug discovery, *Advan. Enzyme Regul.* 47 (2007) 196–207

<sup>170</sup> Ghalbzouri, A.E., Siamari, R., Willemze, R., Ponc, M. Leiden reconstructed human epidermal model as a tool for the evaluation of the skin corrosion and irritation potential according to the ECVAM guidelines *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 1311–1320

<sup>171</sup> Van Midwoud PM, Groothuis GM, Merema MT en Verpoorte E (2010). Microfluidic biochip for the perfusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies. *Biotechnol. Bioeng* 105(1): 184-194.

<sup>172</sup> Van de Kerkhof, E. G. - de Graaf, I. A.M. - Groothuis, G. M.M, In Vitro Methods to Study Intestinal Drug Metabolism, *Current Drug Metabolism*, 2007, 8, 658-675

<sup>173</sup> Lerche-Langrand, C. and Toutain, H.J., Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmacotoxicology, *Toxicology* 153 (2000), pp. 221–253

<sup>174</sup> Vickers A.E.M., Saulnier M., Cruz E., Merema M.T, Rose K., Bentley P. and Olinga P., Organ slice viability extended for pathway characterization: an in vitro model to investigate fibrosis, *Toxicol. Sci.* 82 (2004), pp. 534–544

<sup>175</sup> Fisher, R., Putman, C.W., Koep, L.J., Sipes, G., Gandolfi, A.J., Brendel, K. Cryopreservation of pig and human liver slices, *Cryobiology*, 28 (2), p131-142

<sup>176</sup> Hart, N.A., VanderPlaats, A., Faber, A., Leuvening, H.G.D., Olinga, P., Wiersema-Buist, J., Verkerke, G.J., Rakhorst, G., Ploeg, R.J., Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: An in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects, *Liver Transplantation*, 11(11), 2005: pp 1403-1411

Naast materiaal uit proefdieren is er een beperkt hoeveelheid humaan weefsel materiaal beschikbaar waar onderzoek op gedaan kan worden. Met slicetechnieken kan er *in vitro* naar humaan weefsel gekeken worden. Door te kijken of reacties in slices van dierlijk weefsel de *in vivo* reactie in het dier voorspellen, verwacht men te kunnen voorspellen dat slices van humaan weefsel een soortgelijke voorspellende waarde heeft voor de *in vivo* reactie in de mens<sup>177</sup>.

Volgens critici is de variatie van het gebruikte menselijk materiaal te groot en daarom lastig te interpreteren. Daarnaast zijn er critici die meer zien in celkweken omdat orgaanslices relatief snel dood gaan en de kwaliteit van het systeem snel achteruit gaat. Tot slot is de beschikbaarheid van humaan weefsel een probleem. Het verbeteren van cryopreservatietechnieken zou weefsel beschikbaar kunnen maken voor een grotere groep onderzoekers. Als deze technieken volledig ontwikkeld zijn, is het nog steeds onbekend of er genoeg materiaal zou zijn voor een grootschalig gebruik van orgaanslices van humaan weefsel in Nederland, bijvoorbeeld voor onderzoeksgroepen die niet verbonden zijn aan ziekenhuizen.

### 5.4.9 Samenvatting

Vervangingsalternatieven bestrijken een breed arsenaal aan methoden en benaderingen. Verschillende van deze mogelijkheden kennen een onderzoekdiscipline overstijgende toepassing zoals het gebruik van stamcellen of de omics technologieën, andere alternatieven zijn gebonden aan een enkele onderzoekdiscipline zoals de audio-visuele middelen die vooral van belang zijn in het onderwijs. Vervangingsalternatieven die in de periode tot de peildatum van 2020 tot concrete vervanging zullen leiden zijn vooral de fysisch-chemische en immunochemische methoden, computermodelleringen en de weefselkweek modellen. Binnen de laatste categorie alternatieven zal er toenemend belang zijn in het gebruik van humaan weefsel, van stamcellen en van co-culturen. Verwacht wordt dat ontwikkelingen op het terrein van tissue engineering, omics technologie en systeembioogie meer tijd zullen vergen, maar uiteindelijk voor een substantiële daling in het proefdiergebruik essentieel zullen zijn. Het belang van de vervangingsalternatieven ligt vooral in het feit dat veel van deze methoden inzicht geven in onderliggende mechanismen van ziekteprocessen of stofeffecten of bijdragen aan de karakterisatie van te onderzoeken producten. Een overzicht van trends en ontwikkelingen met betrekking tot vervangingsalternatieven wordt gegeven in Hoofdstuk 8, Tabel 8.3.

---

<sup>177</sup> Elferink, M. G. L., P. Olinga, et al. (2008). "Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity." *Toxicology and Applied Pharmacology* 229(3): 300-309.



## 6 Resultaten vragenlijst

Een elektronische enquête is verstuurd naar 275 onderzoekers, vergunninghouders, proefdierkundigen en onderzoeksverenigingen, NGO's en biotechnici. De enquête bestond uit 3 algemene vragen over de achtergrond van de respondenten, 13 open vragen over huidig 3V onderzoek, 13 open en gesloten vragen over trends met betrekking tot het aantal dierproeven, de relevantie van het diermodel in het wetenschappelijke onderzoek, welzijn van proefdieren en de ontwikkeling van 3V alternatieven. De enquête is verstuurd met het verzoek tot invulling en zo mogelijk verspreiding naar geïnteresseerden.

### 6.1 Respondenten

De enquête is geretourneerd door 20% (n=55) van de aangeschreven met de aantekening dat sommige responsen instituutsbreed waren. Gezien de beperkte respons willen de auteurs de resultaten alleen beschouwen als een mogelijke ondersteuning voor trends die naar voren komen uit de expert-interviews en uit de literatuurstudies.

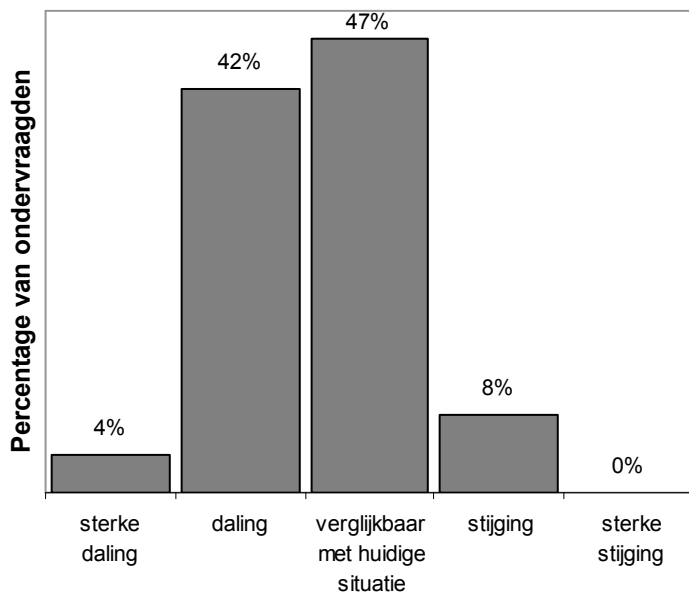
De meeste respondenten waren onderzoeker binnen universiteiten en academische ziekenhuizen. Zij waren betrokken bij onderzoek naar ziekten, onderzoek naar de effecten van voeding of fundamenteel onderzoek (zie tabel 6.1). Een kwart van de respondenten gaf aan betrokken te zijn of zijn geweest bij de ontwikkeling van 3V alternatieven.

Tabel 6.1: Type onderzoek waar de respondenten bij betrokken zijn (n=55)

Onderzoek ziekten aan het zenuwstelsel	7%
Vaccins	9%
Geneesmiddelen onderzoek	7%
Toxicologisch onderzoek	7%
Wetenschappelijke vraag kanker	11%
Wetenschappelijke vraag gedragfysiologie	9%
Wetenschappelijke vraag andere ziekten mens en dier	11%
Andere wetenschappelijke vraag	16%
Onderwijs	4%
Beeldvorming	2%
Genomics	5%
Tissueengineering	2%
Anders	9%

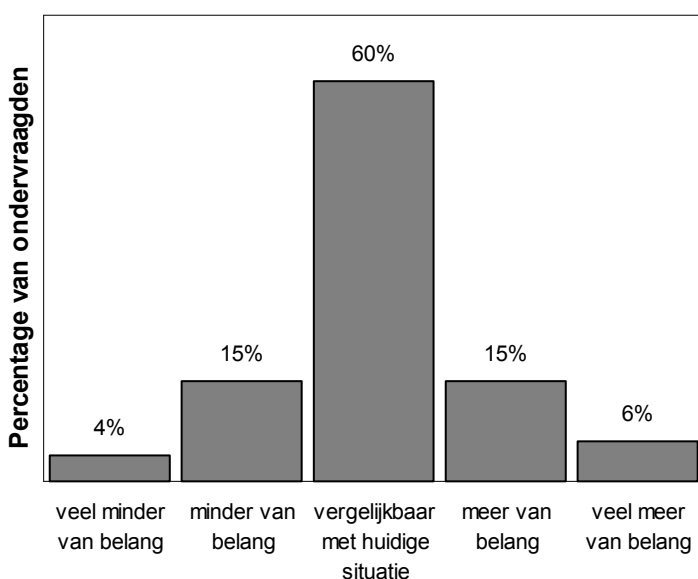
### 6.2 Resultaten gesloten vragen

De verwachtingen zijn verschillend ten aanzien van de aantallen dierexperimenten die uitgevoerd zullen worden in 2020 (zie grafiek 6.1). 46 % van de respondenten verwacht een daling van het aantal dierproeven en 47% verwacht dat het aantal dierproeven gelijk zal blijven. Slechts een klein percentage (8%) verwacht een stijging van het aantal dierproeven.



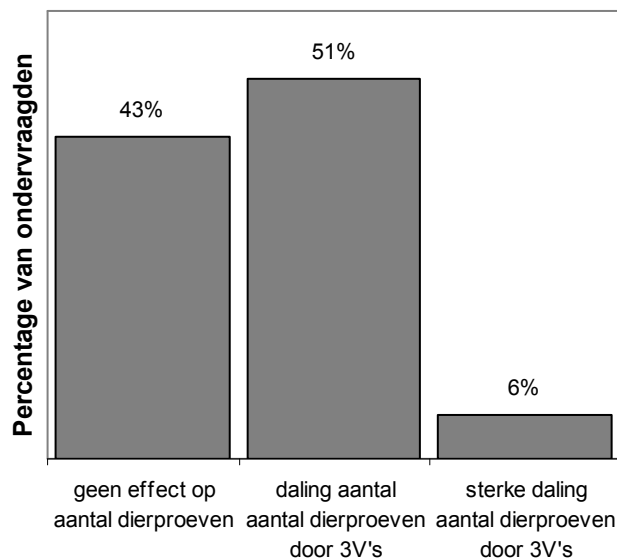
Grafiek 6.1: Verwachtingen over het aantal dierproeven in 2020

De meeste respondenten verwachten niet dat het belang van proefdieren als model binnen het onderzoek zal afnemen en dat dit een daling zal bewerkstelligen van het aantal dierproeven (zie grafiek 6.2) 60% van de respondenten verwacht dat het belang van het proefdier als model gelijk zal blijven.



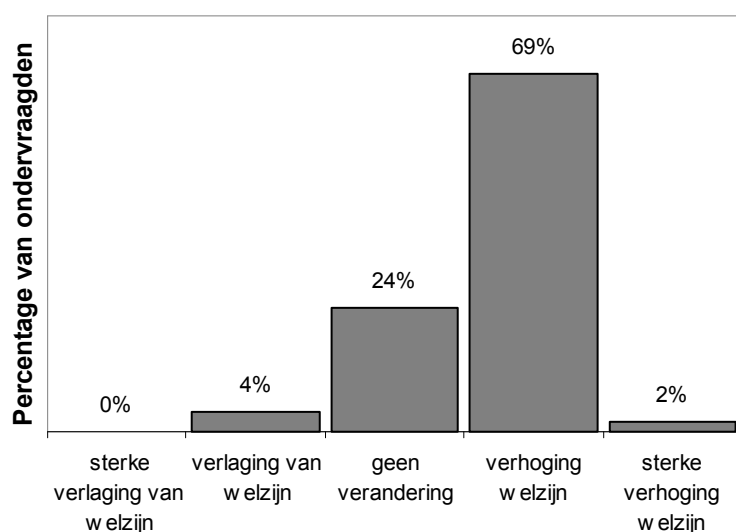
Grafiek 6.2: Verwachtingen over de relevantie van het diermodel in onderzoek en onderwijs in 2020.

De verwachtingen met betrekking tot het effect van 3V alternatieven zijn divers (zie grafiek 6.3) iets meer dan de helft (57%) van de respondenten gaan uit van een daling in het aantal dierproeven vanwege de implementatie van 3V alternatieven. 43% verwacht dat 3V alternatieven de aantallen dierproeven niet zal beïnvloeden.



Grafiek 6.3: Verwachtingen over de mate waarin trends met betrekking tot 3V alternatieven het aantal dierproeven zal laten dalen.

Met betrekking tot het welzijn van dierproeven verwacht de meerderheid van de respondenten dat deze zal verbeteren (zie grafiek 6.4)



Grafiek 6.4: Verwachtingen met betrekking tot het welzijn van proefdieren in 2020.

### 6.3 Resultaten open vragen

Toenemende regulering werd gezien als een belangrijke trend met betrekking tot het aantal dierproeven, welzijn en 3V alternatieven. Tegenstrijdige effecten werden genoemd. Regulering zou zowel het aantal dierproeven kunnen doen stijgen als doen dalen, het welzijn kunnen doen verminderen als doen toenemen en ontwikkelingen met betrekking tot 3V alternatieven kunnen doen stimuleren. Deze tegenstrijdige effecten zijn het resultaat van tegenstrijdige wetgeving, zoals regulering rond veiligheidsaspecten van chemische stoffen en veranderingen in Directive 86/609/EEC; de Europese wetgeving op het gebied van dierexperimenteel

onderzoek. Daarnaast echter is en wordt gewerkt aan regulering die als resultaat kan hebben dat het aantal dierproeven omhoog zal gaan of het welzijn voor de dieren zal verminderen. Een duidelijk voorbeeld hiervan is de REACH wetgeving die zal leiden tot een toename van het onderzoek in het kader van de risico beoordeling van chemische stoffen.

### Wetenschappelijke trends

Over de effecten van sommige wetenschappelijke ontwikkelingen was men verdeeld. Zo werden de “Omics” ontwikkelingen gezien als een trend die het aantal dierproeven zal kunnen doen toenemen en juist doen afnemen, het welzijn kunnen doen afnemen en juist het gebruik van 3V alternatieven zal kunnen doen stimuleren. Onderzoek naar infectieziekten en chronische- en verouderingsziekten, als kanker en ziekten van het zenuwstelsel, zouden naar verwachting het dierwelzijn van proefdieren doen verminderen.

*In vitro* en *in silico* methoden, verfijning van meetmethoden en non- invasieve technieken, meer kennis over diergedrag, zijn de belangrijkste trends die volgens de respondenten het ongerief van proefdieren kunnen doen afnemen en tot een vermindering in het proefdiergebruik kunnen leiden. Weefselkweek, stamcelonderzoek en weefsellices zijn *in vitro* technieken die veel genoemd worden in relatie tot een discipline overstijgende toepassing.

### Trends binnen de markt

Met markt worden de maatschappelijke ontwikkelingen bedoeld die, direct of indirect, invloed kunnen uitoefenen op het proefdiergebruik. De respondenten verwachten dat de maatschappij om verlaging van het aantal dierproeven zal blijven vragen. Het duurder worden van proefdierfaciliteiten dierverblijven door hogere eisen aan huisvesting, toenemende regulering rondom de goedkeuring voor dierexperimenteel onderzoek, en het beschikbaar komen van fondsen van 3V alternatieven werden gezien als belangrijke stimuli om deze vermindering van het aantal dierproeven te bewerkstelligen. Daarnaast zagen de respondenten de toenemende vraag naar infectieziekten onderzoek, de vraag naar nieuwe, innovatieve en persoonsgerichte geneesmiddelen, hoge veiligheidseisen voor chemicaliën, voeding en medicijnen als trends die het aantal dierproeven zullen laten stijgen. Zie voor een overzicht van de belangrijkste trends box 6.1

**Box 6.1: Resultaten enquête: Trends met betrekking tot het aantal dierproeven, welzijn en ongerief van proefdieren en 3V alternatieven (informatie is alleen kwalitatief).**

*Belangrijke trends die aantal dierproeven doen stijgen*

- Toenemende vraag naar veiligheid vanuit de maatschappij en de politiek
- Regulering die onderzoek naar veiligheid van chemicaliën en voeding stimuleert (REACH en EU wetgeving met betrekking tot voeding)
- Meer kennis over ziekten en daardoor een grotere vraag naar specifieke medicijnen
- Toenemende prevalentie van/voor infectieziekten in de wereld

*Belangrijke trends die ongerief bij dieren doen verhogen:*

- Meer onderzoek naar complexe ziekten (kanker, ziekten van het centraal zenuwstelsel en ouderdomsziekten)
- Regulering die dierproeven vereisen (bijv. REACH) en regelgeving met betrekking tot huisvesting en zorg (respondenten verwachten dat al te strikte regulering kan leiden tot minder mogelijkheden voor aanpassingen aan het individuele dier)
- Door economische invloeden geen geld voor het verbeteren van huisvesting en het verhuizen van onderzoek naar landen buiten de EU
- Grotere vraag naar mechanistisch biomoleculair onderzoek (idem)
- Meer omics onderzoek en meer aandacht voor systeembio

*Belangrijke trends die aantal dierproeven laten dalen*

- Regulering die de ontwikkeling van 3V alternatieven stimuleert (Wod en revisie Directive 86/609/EEC, maar ook REACH en cosmetica richtlijn).
- Ontwikkeling van 3V alternatieven in het algemeen
- Genomics-onderzoek
- Kosten van dierexperimenteel onderzoek

*Belangrijke trends die het welzijn van proefdieren zullen verbeteren*

- Huisvesting die elementen van soortspecifiek gedrag mogelijk maakt
- Meer kennis over pijn en controle over pijn
- Regelgeving met betrekking tot huisvesting en zorg
- Meer kennis over ethologie en soortspecifiek gedrag
- Technologieën die verfijning van meetmethoden bewerkstelligen (bijv. niet invasieve biomarkers en microtechnieken)

*Belangrijke trends die verminderingalternatieven zullen stimuleren:*

- Regulering die de ontwikkeling van 3V alternatieven stimuleren en dierexperimenteel onderzoek ontmoedigen
- Verbetering van meetmethoden (bijv. imaging, micro-techniques)
- Wetenschappelijke ontwikkeling met betrekking tot in vitro methoden (cellijnen, stamcelonderzoek en tissue engineering) en het gebruik van humaan weefsel
- Financiële ondersteuning van de ontwikkeling van 3V alternatieven
- Omics onderzoek (verbeterd de mogelijkheden voor onderzoek in vivo in de mens en in vitro)

*Belangrijke trends die vervangingsalternatieven zullen stimuleren*

- Wetenschappelijke ontwikkelingen met betrekking tot in vitro methoden en het gebruik van humaan weefsel
- Financiële ondersteuning van de ontwikkeling van 3V alternatieven
- Ontwikkelingen van verbeterde *in silico* modellen
- Verandering in regulering die screening in vervangingsalternatieven afdwingen
- Politieke en maatschappelijke druk die dierexperimenten moeten vervangen

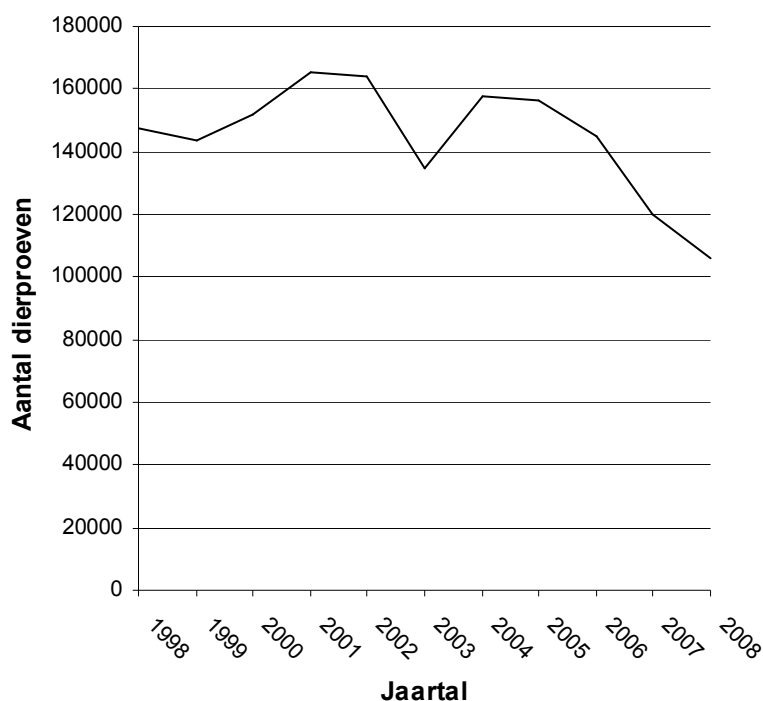


## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik

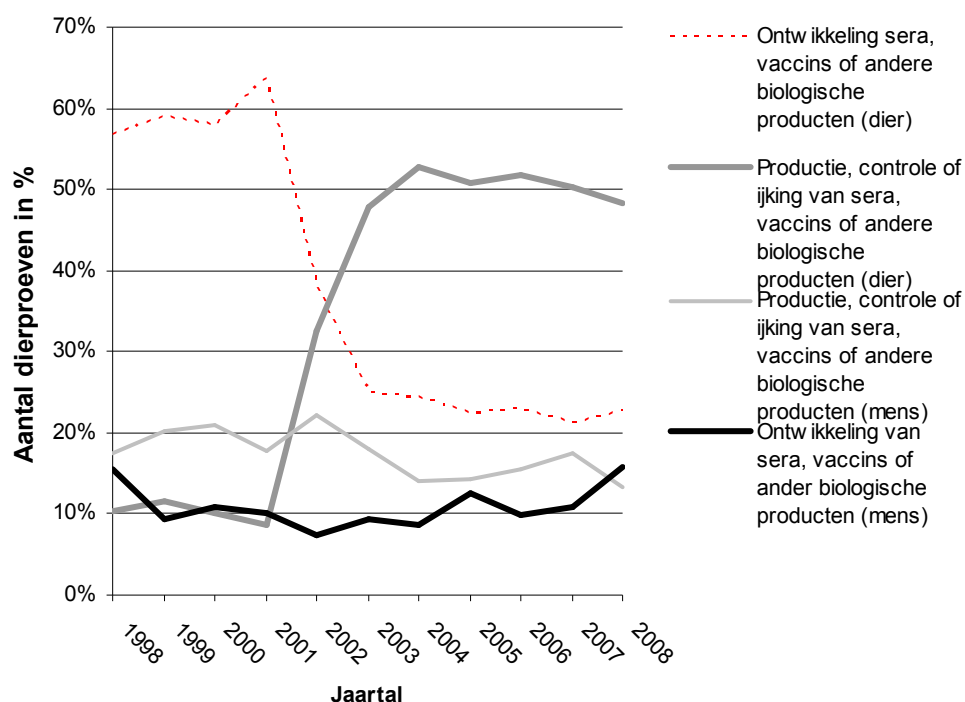
### 7.1 Biologische producten

Biologische producten kunnen omschreven worden als producten die onder laboratoriumomstandigheden geproduceerd worden door of uit levende organismen (eencelligen, planten of dieren), soms door gebruik te maken van biotechnologie, waarbij de producten profylactisch of therapeutisch kunnen worden toegepast binnen de humane of veterinaire praktijk. Producten die tot de categorie van de biologicals behoren zijn vaccins, hormoonpreparaten, rDNA producten, sera, monoclonale antistoffen, bloedproducten, e.a. biologicals.

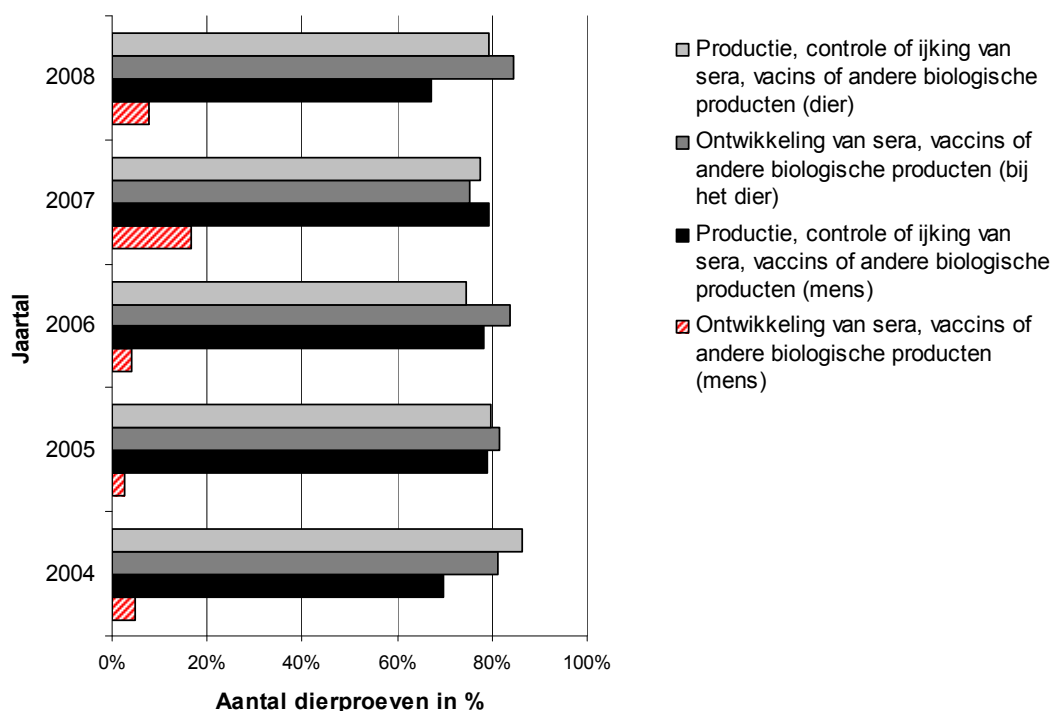
De kengetallen voor deze categorie staan weergegeven in de grafieken 7.1.1 – 7.1.4.



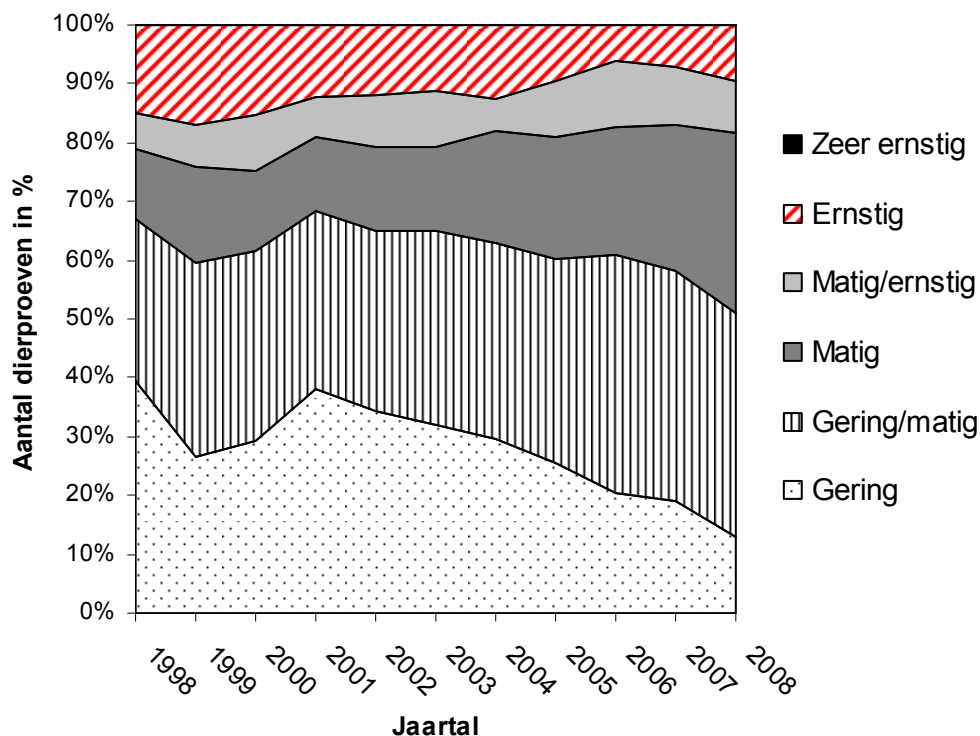
Grafiek 7.1.1: Totaal aantal dierproeven voor subdoelen biologische producten in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.1.2: Aantal dierproeven uitgevoerd voor de verschillende subdoelen bij de ontwikkeling van sera, vaccins of andere biologische producten voor de mens en dier in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008)



Grafiek 7.1.3: Percentage dierproeven uitgevoerd in het kader van wettelijke bepalingen bij de verschillende subdoelen bij de ontwikkeling, productie, controle en ijking van sera, vaccins of andere biologische producten in Nederland van 2004-2008 (Bron: Zo doende: 2004-2008).



Grafiek 7.1.4: Mate van ongerief bij de ontwikkeling, productie, controle of ijking van biologische producten voor mens en dier (in % van totaal gebruikt voor biologische producten) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Samenvattend kan worden gesteld dat het proefdiergebruik voor de categorie van de Biologicals omvangrijk is, een substantieel deel van de proefdieren voor regulatoire doeleinden worden gebruikt en het ongerief, in vergelijking met andere categorieën van proefdiergebruik, hoog is.

### 7.1.1 Vaccins

Vaccins worden bereid door virulente micro-organismen of producten hiervan te inactiveren of verzwakte (geattenuerde) stammen van het micro-organisme te gebruiken. Aan vaccins wordt veelal een adjuvant toegevoegd om de werkzaamheid van het product te vergroten. De nieuwere generatie vaccins bestaan veelal niet meer uit het gehele micro-organisme maar uit die onderdelen van het micro-organisme (antigenen) die belangrijk zijn voor het opwekken van een effectieve immuunrespons. De nieuwere generaties vaccins (subunit vaccins en rDNA vaccins) zijn beter gedefinieerd dan de klassiek geproduceerde vaccins.

Het belang van vaccins in onze maatschappij neemt toe. Hieraan liggen diverse redenen ten grondslag:

- Kosten-baten overwegingen: Profylactische maatregelen als vaccinatie dragen bij aan een kosten effectieve gezondheidszorg;
- 'Emerging diseases': nieuwe of nieuwe varianten van besmettelijke, vaak zoönotische, ziekten die voor grote onrust zorgen in de maatschappij. Voorbeelden hiervan zijn AIDS, SARS, de influenza varianten, Q-koort en Blue Tongue.
- Resistentie problematiek. Het gebruik van antibiotica heeft in de loop der jaren geleid tot een toenemende resistentie van bacteriën tegen deze

producten. Een accentverschuiving van therapie naar profylaxe zou dit probleem kunnen verminderen.

- Life style: toenemend verkeer naar verre (exotische) bestemmingen maakt vaccinatie van reizigers belangrijker. Daarnaast verhoogt het toenemend reisverkeer de kans op uitwisseling en de import van infectieziekten (bijvoorbeeld Ebola).
- Klimaatveranderingen waardoor voordien uitheemse ziekten een potentieel risico gaan worden in de westerse landen.
- Bioterrorisme: Het verspreiden van besmettelijke ziekten zoals miltvuur en pokken zijn opties die in het kader van terroristische dreigingen als realistisch worden beschouwd.
- Dierhouderij: ontwikkelingen in de huisvesting van landbouwhuisdieren gaan in de richting van schaalvergroting en concentratie. Bijbehorende consequentie is een mogelijke toename in infectiedruk, hetgeen preventieve vaccinatie noodzakelijk maakt. Een actueel voorbeeld is de toenemende vraag naar visvaccins, dit in het kader van de intensivering van de commerciële vishouderij.
- Nieuwe toepassingen. Er bestaat een toenemende vraag naar vaccins voor andere toepassingen dan infectieziekten. Onderzoek vindt onder andere plaats naar vaccins tegen kanker, als voorbehoedsmiddel, tegen roken, e.d.

### Doeleinden proefdiergebruik vaccins

#### *Ontwikkeling van nieuwe vaccins*

In de ontwikkeling van nieuwe vaccins zijn 2 fasen te onderscheiden: Research & Development (R&D) en de preklinische fase. In de R&D fase worden proefdieren vooral gebruikt voor het opzetten van een gevoelig proefdiermodel, voor de beoordeling van de immunogeniciteit van het verzwakte of geïnactiveerde micro-organisme of de geïsoleerde antigenen, voor mogelijke restvirulentie en voor de keuze van het adjuvant. Het preklinische onderzoek richt zich vooral op de inspuitroute, de te gebruiken vaccindosis en immunisatie frequentie, mogelijke bijwerkingen en combinatie van het vaccin met andere vaccinproducten. Voor veterinaire vaccins geldt dat het product in klinische studies getest wordt in zogenaamde veldproeven, veelal onderzoek in praktijkomstandigheden. In het bijzonder de resultaten van het preklinisch en (veterinaire vaccins) klinisch onderzoek worden gebruikt voor het registratiedossier dat voor toelating op de markt aan de registratie autoriteiten moeten worden overlegd.

#### *Productie van vaccins*

Kweek van het micro-organisme in proefdieren is alleen relevant voor virale vaccins. In het verleden werden voor dit doel grote aantallen proefdieren gebruikt. Voorbeeld hiervan is de kweek van het polio-myelitis (kinderverlamming) virus in apenniercellen. Tegenwoordig zijn er nog maar een beperkt aantal virale vaccins dat het gebruik van proefdieren noodzakelijk maakt. Veelal vindt virusvermeerdering in cellijnen plaats of in bebroede kippeneieren.

#### *Vrijgifte controle van partijen geproduceerde vaccins*

Elke geproduceerde partij vaccins dient op kwaliteit te worden beoordeeld voordat het door de autoriteiten wordt vrijgegeven voor toelating op de Nederlandse markt. Voor wat betreft het proefdiergebruik zijn in de vrijgifte controle vooral het onderzoek naar veiligheid en werkzaamheid van belang. Bij het veiligheidsonderzoek wordt gekeken naar mogelijke schadelijke effecten van het vaccinantigeen en naar bijwerkingen gerelateerd aan andere vaccincomponenten. Bij het werkzaamheidsonderzoek wordt beoordeeld of het vaccin in staat is een

beschermende immuunrespons op te wekken. Op een enkele uitzondering daargelaten wordt de werkzaamheid van levende verzwakte vaccins bepaald met behulp van *in vitro* methoden. Voor de geïnactiveerde vaccins bestaan vaak diermodellen.

Vrijgifte onderzoek wordt uitgevoerd door de vaccinfabrikant. Een eventuele hercontrole kan plaatsvinden door een door de autoriteiten aan te wijzen laboratorium. Binnen de Europese Lidstaten zijn dit de OMCLs (Official Medicines Control Laboratories).

### Trends proefdiergebruik vaccins

De geïnterviewden verwachten dat de belangrijkste trends op het gebied van proefdiergebruik voor vaccindoeleinden zich zullen voordoen op de volgende onderwerpen: de ontwikkeling van nieuwe en nieuwe generatie vaccins, het gebruik van 3V methoden in vaccin R&D en preklinisch onderzoek, het gebruik van *in vitro* methoden voor vaccinproductie, het toenemend gebruik van 3V methoden in de vrijgifte controle en daarnaast een paradigma verandering in de vrijgifte controle gebaseerd op het aantonen van consistentie in productie.

#### *Ontwikkeling van nieuwe vaccins*

Vaccin R&D en preklinisch onderzoek is deels gebaseerd op dierexperimenteel onderzoek. Dit zal ook in de toekomst noodzakelijk blijven. Verwacht mag worden dat een toenemende druk op vaccinontwikkeling zal leiden tot een toename in het proefdiergebruik.

#### *Ontwikkeling van nieuwe generatie vaccins*

Anders dan voor de klassieke vaccins die gebaseerd waren op geïnactiveerde of verzwakte micro-organismen is de hedendaagse vaccinontwikkeling er op gericht producten tijdens de R&D fase goed te karakteriseren en alleen die antigeencomponenten te gebruiken die voor de opbouw van de beschermende immuunrespons noodzakelijk zijn. Hoewel dit het proefdiergebruik in de R&D fase zal doen toenemen, maakt de betere karakterisering indirect een verlaging van het proefdiergebruik mogelijk voor de batchgewijze vrijgifte.

#### *Toenemend gebruik van 3V methoden in vaccin R&D en preklinisch onderzoek*

Door geïnterviewden wordt een toenemend belang van 3V methoden in vaccin R&D en preklinisch onderzoek genoemd. Dit belang ligt binnen het R&D onderzoek vooral in het gebruik van *in vitro* methoden voor de selectie en pre-screening van potentiële vaccinantigenen en voor de beoordeling van adjuvantia. Het gaat hier bij om weefselkweek modellen op basis van cellen van het immuunsysteem, om fysisch-chemische methoden voor de bestudering van de antigeen structuur en om immuno-chemische modellen voor antigeenbinding studies. Voorlopig echter lijkt een vervanging van proefdieren uitgesloten, vooral wanneer het gaat om de bestudering van complexe immunologische reacties en worden de 3Vs vooral genoemd in relatie tot een vermindering in aantallen dier per experiment en in een verfijning van het onderzoek (o.a. humane eindpunten).

#### *Gebruik van *in vitro* methoden voor virusvaccin productie*

Proefdieren of proefdierweefsel voor virus vaccinproductie zullen in de komende jaren verder vervangen worden door het gebruik van continue cellijnen. Achterliggende redenen hiervoor zijn eerder praktisch en technisch dan ethisch. Het gebruik van cellijnen maakt het mogelijk de viruskweek op te schalen en vormt daarmee een gezocht alternatief voor de kweek die thans nog in bebroede (kippen)eieren plaatsvindt. Daarnaast vormen primaire of doorgekweekte

diercellen/bebroede eieren een intrinsiek risico voor overbrenging van infectieuze micro-organismen.

### *Toenemend gebruik van 3V methoden in vrijgifte controle*

Het afgelopen decennium is een groot aantal 3V methoden in de wettelijk verplichte vrijgifte van vaccins geïntroduceerd<sup>178</sup> (tabel 1). In enkele gevallen heeft dit geleid tot het niet langer verplicht stellen van uitvoering van een controle test. Veelal gaat het om een vervanging of verfijning in het proefdiergebruik, zoals de mogelijkheid humane eindpunten toe te passen of de vervanging van challenge experimenten door experimenten waarbij de mate van bescherming gemeten wordt aan de hand van antistoftiters. Verwacht mag worden dat de implementatie van 3V methoden, zij het geleidelijk, door zal zetten. Vooruitgang valt vooral te boeken bij de veterinaire vaccins, waarbij accenten zullen liggen op vervanging van werkzaamheids- en veiligheidstesten door proefdiervrije methoden als ELISA technieken en *in vitro* methoden.

Een ontwikkeling die de komende jaren zal doorzetten is een paradigma wijziging met betrekking tot de wettelijk verplichte vrijgifte van vaccins. Het betreft hier de consistency benadering waarbij de kwaliteit van een partij vaccin gerelateerd wordt aan een voorgaande partij die op basis van uitvoering onderzoek bewezen heeft veilig en werkzaam te zijn<sup>179</sup>. Zie voor een bespreking van de consistency approach Hoofdstuk 4.3.3.

### *Trends met betrekking tot adjuvantia*

Daarnaast zijn sommige soorten adjuvantia ook in staat de immuunrespons te moduleren. Er zijn vele typen adjuvantia zoals oliën en lipolysachariden uit de wand van bacteriën, en aluminiumzouten. Aspecten die bij de ontwikkeling van nieuw adjuvantia centraal staat zijn de mogelijke bijwerkingen van dergelijke producten en het immuunpotentierende en immuunmodulerende vermogen. Voor het testen van adjuvantia worden vooral muizen gebruikt. Andere modellen zijn cavia, konijn, geit en niet humane primaten als de baviaan<sup>180</sup>. Er zijn geen specifieke aantallen van dierproeven bekend die gebruikt worden voor het testen van adjuvantia. Er lijkt een noodzaak te zijn voor het vinden van nieuwe soorten adjuvantia. Door gebruik van moleculair biologische technieken zijn nieuwe vaccinepitopen gevonden die het gebruik van specifieke adjuvantia noodzakelijk maken. Er is dan ook een behoefte aan nieuwe typen adjuvantia<sup>181</sup> en in het bijzonder naar *in vitro* modellen voor het ophelderen van werkingsmechanismen. Vooruitgang op dit terrein wordt geboekt<sup>182</sup>.

## 7.1.2 Hormoonpreparaten

### Introductie

Twee aspecten met betrekking tot de productie van hormoonpreparaten zijn relevant in het kader van proefdiergebruik. Het betreft de ontwikkeling en registratie van nieuwe preparaten en de wettelijk verplichte vrijgifte controle. Europees gezien

---

<sup>178</sup> Hendriksen CFM Hendriksen CF. (2009). Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev.Vaccines* 8(3): 313-322.

<sup>179</sup> Hendriksen C.F.M., Arciniega J.L., Bruckner L, et.al. (2008) The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals* 36 (1): 73-77.

<sup>180</sup> Alving, C. R. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials, *Vaccine*, 2002, 20: 3, S56-S64

<sup>181</sup> Reed, S.G. Bertholet, S. Coler, R. N. Friede M. New Horizons in adjuvants for vaccine development, *Trends in Immunology*, 2009, 30; 1, p23-32

<sup>182</sup> Boele MC, Bajramovic JJ, de Vries AM et al. (2009). Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules. *Cell Immunol.* 255(1-2): 17-25

verloopt de registratie van nieuwe preparaten veelal via EMEA, de vrijgifte controle volgt de monografie voorschriften van de Europese Farmacopee.

In de historische geplaatst vormen de hormoonpreparaten een interessante casus om veranderingen in proefdiergebruik te illustreren. In het recente verleden waren grote aantallen dieren nodig voor de vrijgifte controle. De omvang hiervan is echter de laatste jaren sterk gereduceerd. Daarentegen is het aantal dieren nodig in de R&D van nieuwe preparaten en vooral in het preklinisch onderzoek toegenomen. Per saldo echter is het gebruik van dieren voor hormoonpreparaten aanzienlijk gedaald.

### Hormoonpreparaten: R&D en preklinisch onderzoek

Veel van de klassieke hormoonpreparaten zijn natuurlijk geproduceerde stoffen, geïsoleerd uit bijvoorbeeld urine of dierlijke organen. Deze preparaten zijn inmiddels grotendeels vervangen door rDNA producten, geproduceerd in CHO cellen. Dit zijn beter gedefinieerde producten, waardoor de vrijgifte controle veelal beperkt kan blijven. In het R&D onderzoek is de aandacht vooral gericht op *in vitro* receptor-bindingsstudies en *in vitro* bioactiviteitsstudies. Voor het registratie dossier is *in vivo* onderzoek op werkzaamheid en productveiligheid belangrijk.

Een nieuwe trend in de product ontwikkeling is de chemische synthese. Hierbij worden organische verbindingen gesynthetiseerd die de hormoonreceptoren op dezelfde manier activeren als de rDNA producten. Hormoonontwikkeling betreedt hiermee het terrein van de farmaca. Consequentie hiervan is dat de teststrategie voor de registratie van deze producten die van de farmacologische producten gaat volgen, dat wil zeggen op farmacologische testen (farmacokinetiek en farmacodynamiek) en op toxicologische testen. Als gevolg hiervan is een (beperkte) toename in het proefdiergebruik te verwachten.

### Hormoonpreparaten: vrijgifte controle

Veel van de diertesten die waren voorgeschreven voor de vrijgifte controle van klassiek geproduceerde vaccins zijn inmiddels vervangen door fysisch-chemische methoden zoals capillair iso-electroforese. Onlangs is bijvoorbeeld de vrijgifte test voor onderzoek op werkzaamheid van het Follikel Stimulerend Hormoon, een rattenmodel, vervangen door een fysisch-chemische methode. De besparing die hierdoor in het proefdiergebruik is bereikt is aanzienlijk geweest<sup>183</sup>.

### 7.1.3 *Monoclonale antistoffen*

Een bijzondere categorie van biologische producten vormt de groep van de monoclonale antistoffen (mAbs). Bijzonder in relatie tot de beoordeling van de veiligheid van deze producten en bijzonder in termen van proefdiergebruik. Tto voor kort werden mAbs voornamelijk gebruikt in onderzoek en diagnostiek en vond productie plaats in muizen. Echter, bij de productie van de nieuwe generatie mAbs, zeker die voor klinische toepassingen worden gebruikt, spelen moleculair biologische technieken een rol. Tegenwoordig wordt gebruik gemaakt van gehumaniseerde mAbs en van humane mAbs. Bij gehumaniseerde antistoffen heeft nog een klein deel van het antistof molecuul een muizenachtergrond, bij humane mAbs is het gehele molecuul humaan. Door het humaniseren van de mAbs is de specificiteit van deze antistoffen sterk toegenomen waardoor de antistoffen zeer aantrekkelijk worden voor gebruik in de kliniek. In 2006 waren 18 mAbs geregistreerd, in 2010 zullen dat er

---

<sup>183</sup> Mulders JW, Derksen M, Swolfs A, Maris F. (1997). Prediction of the *in vivo* biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. *Biologicals* 25(3): 269-281

waarschijnlijk 240 zijn. Toepassing vinden de mAbs vooral in het onderzoek naar en de behandeling van kanker, (auto)immuunziekten als psoriasis or reumatoïde artritis, infectie ziekten en cardio-vasculaire aandoening<sup>184</sup>. mAbs onderscheiden zich van de traditionele farmaca in de zin dat het hoog-moleculaire eiwitten zijn, een grote mate van specificiteit bezitten, bij inspuiting in een niet-soort specifiek organisme een immuunreactie opwekken en een lange halfwaarde tijd hebben (de tijd waarin de helft van de stoffen door het lichaam is afgebroken of uitgescheiden). Dat biedt voordelen bij de behandeling van ziekten maar kent ook nadelen. De nadelen liggen vooral op het vlak van bijwerkingen en op het vlak van de modellen die gebruikt worden voor de veiligheidsevaluatie. mAbs kunnen immuun-gemedieerde bijwerkingen opwekken zoals autoimmunitet of anafylctische reacties. Dit was bijvoorbeeld het geval in de klinische studie (Fase 1) van de anti-CD28 super agonist TGN1412 in 2006.

Problemen voor de veiligheidsevaluatie van mAbs in het preklinisch onderzoek liggen in het feit dat traditionele diermodellen als muis en rat veelal niet voldoen omdat inspuiting van de humane of gehumaniseerde mAb in deze diersoorten leidt tot een immuunreactie en een snelle verwijdering van de mAb uit het lichaam, tot een anafylactische reactie of tot een wijziging in de farmacokinetiek van de mAb. In het onderzoek worden dan ook speciale eisen gesteld aan de keuze van het diermodel: er moet kruisreactiviteit zijn aangetoond tussen doeldier (veelal mens) en onderzoeksmodel, de stof moet op een vergelijkbare wijze farmacologisch actief zijn in het diermodel als in de mens en de expressie in relevante weefsels tussen mens en dier moeten overeenkomen. De praktijk is dat, vanwege de verwachte genetische en farmacologische vergelijkbaarheid, vaak gebruik maakt wordt van onderzoek in primaten (vooral de Rhesus aap en de Java aap). Naast veiligheidsonderzoek in primaten worden ook andere diersoorten gebruikt voor aspecten van de veiligheid zoals knaagdieren voor acute toxiciteit<sup>185</sup>. Daarnaast worden dierstudies ondersteund door in vitro onderzoek met menselijke en dierlijke weefsels, onder andere om de mate van kruisreactiviteit te bestuderen tussen doeldier en proefdier en om naar specificiteit in binding te kijken.

### Mogelijkheden van alternatieven

Voor het veiligheidsonderzoek van mAbs geldt dat in algemene zin geen regels zijn op te stellen maar dat het onderzoek moet zijn afgestemd op het specifieke product. Helaas is er een ontwikkeling binnen de regelgeving die een vast schema van onderzoek voorstaat. Daardoor kan het voorkomen dat primaten onderzoek wordt uitgevoerd waarbij niet aan de voorwaarden van kruisreactiviteit en vergelijkbaarheid tussen primate en mens is voldaan. Dat geldt ook voor de noodzaak om onderzoek in een 2<sup>e</sup> diersoort te doen, vaak in een knaagdier, ook als is aangetoond dat de primate een relevant model is en om die reden met de resultaten van dit onderzoek zou kunnen worden volstaan.

Als 'alternatief' voor de primate kan in sommige gevallen een TG (gehumaniseerde) muis gebruikt worden, mogelijk niet als vervanging maar voor deelaspecten van de veiligheidsevaluatie.

---

<sup>184</sup> NC3R. (2006) Opportunities for reducing the use of non-human primates in the development of monoclonal antibodies- a workshop report

<sup>185</sup> Muller, PY and Brennan, FR Safety Assessment and Dose Selection for First-in-Human Clinical Trials With Immunomodulatory Monoclonal Antibodies, *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 2009, 85(3): 247

Aandacht is er ook voor het gebruik van zogenaamde surrogaat mAbs. Bij deze benadering wordt in het ontwikkelingstraject van de humane mAb ook een muizen mAb ontwikkeld met een vergelijkbare farmacologische en farmacokinetische werking. Aspecten van de veiligheid kunnen vervolgens in de muis worden bestudeerd. Aan het einde van het ontwikkelingsproces dient wel een extrapolatie van resultaten naar het humane mAb plaatsvinden, waarbij mogelijk beperkt onderzoek in primaten nodig is.

Tenslotte kan onderzoek in de mens op basis van micro-dosering waardevolle informatie verschaffen over distributie en kinetiek. Dit onderzoek zal echter alleen uitgevoerd worden op basis van pre-informatie verkregen uit dierproeven.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven categorie Biologische producten

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
Vaccins		XXX	XXX				X	XXX
Hormoon preparaten			XXX					
mAbs		XX				X		X

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

## 7.2 Geneesmiddelen

### 7.2.1 Introductie

Geneesmiddelen worden in dit rapport gedefinieerd als chemische stoffen met farmacologische eigenschappen die niet door of uit levende organismen zijn geproduceerd. Nederland is een middel groot land als het gaat om de innovatieve farmaceutische markt. In Nederland bedraagt de totale omzet van farmaceutische bedrijven zo 'n 4, 9 miljard Euro<sup>186,187</sup>

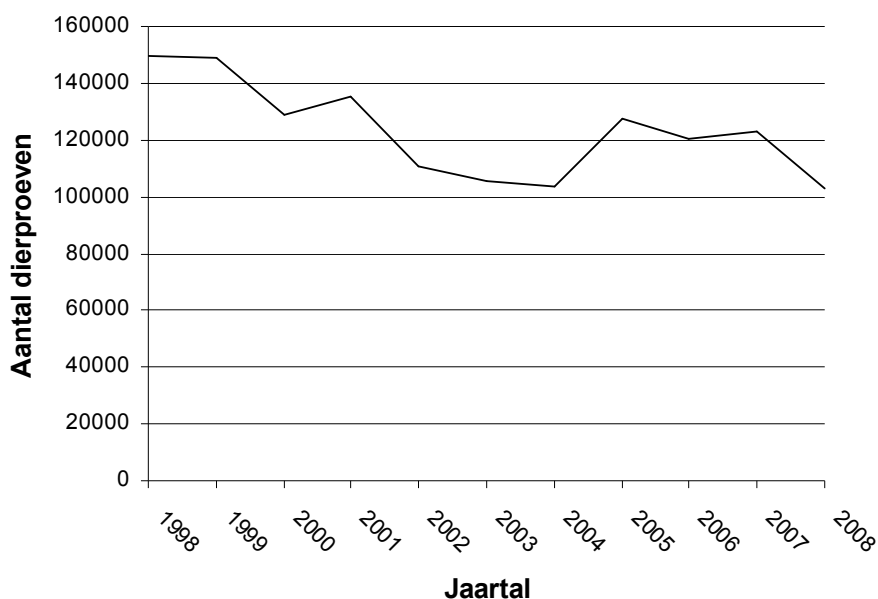
Het proefdiergebruik voor de categorie geneesmiddelen is omvangrijk (zie grafiek 7.2.1 en 7.2.2). Zo werd in 2008 achttien procent van het totaal aantal dierproeven uitgevoerd voor de ontwikkeling, productie, controle en ijking van geneesmiddelen voor mens en dier<sup>188</sup>. Daarmee behoren twee subdoelstellingen van het domein geneesmiddelen tot de tien subdoelstellingen waar de meeste proefdieren voor gebruikt worden (zie tabel 3.1 en 3.2). Verder is het aantal dierproeven dat uitgevoerd wordt om te voldoen aan wettelijke bepalingen zeer omvangrijk (grafiek 7.2.3). Tot slot lijkt het aantal proefdieren wat gering ongerief ondervindt de laatste jaren te zijn afgenomen van 60% naar 25%. De laatste jaren wordt van de meeste dierproeven het ongerief geschat op gering/matig tot matig (grafiek 7.2.4).

<sup>186</sup> European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA), The pharmaceutical industry in figures, 2009

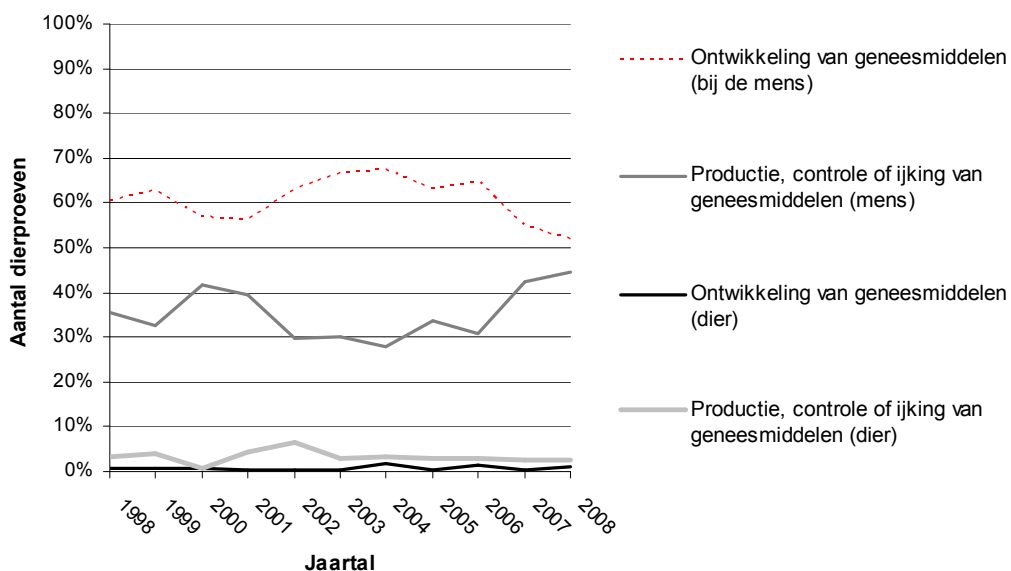
<sup>187</sup> Nefarma, Nefarmafeiten, 2008

<sup>188</sup> VWA, Zodoende, 2008

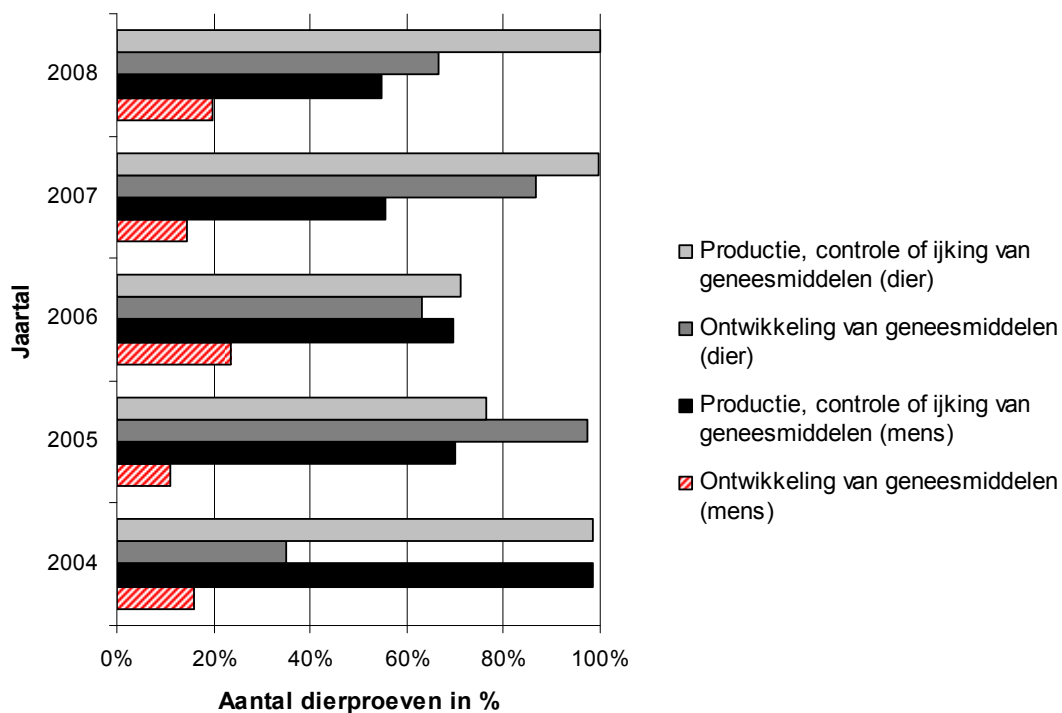
## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



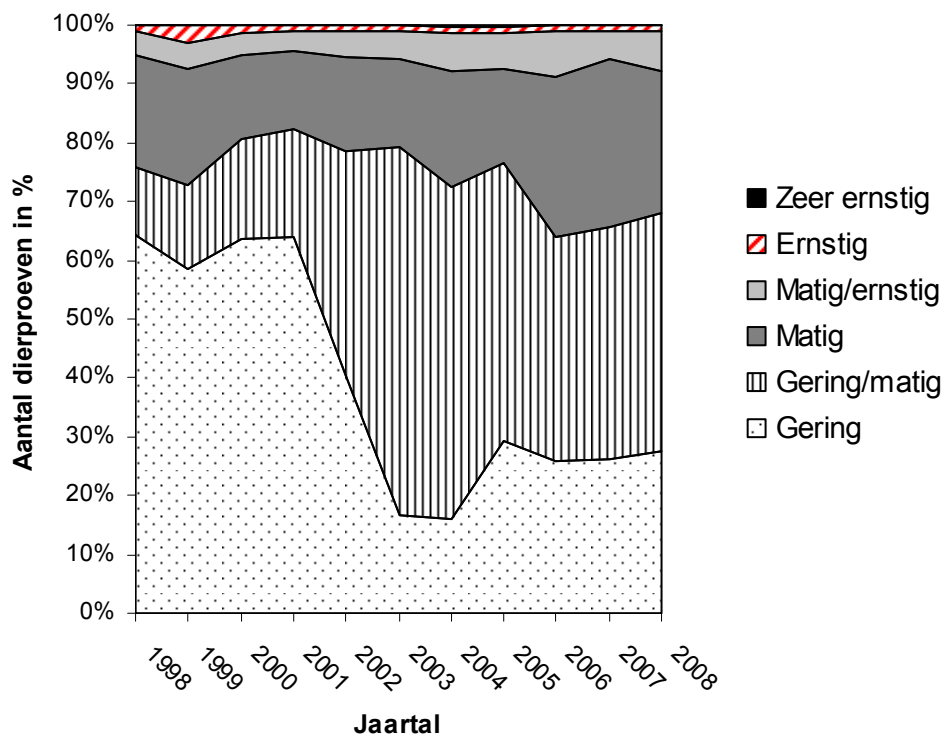
Grafiek 7.2.1: Totaal aantal dierproeven uitgevoerd voor de ontwikkeling, productie, controle of ijking van geneesmiddelen voor mens en dier in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.2.2: Aantal dierproeven uitgevoerd voor de verschillende subdoelen in de ontwikkeling, de productie, controle of ijking van geneesmiddelen voor mens en dier (in % van het totaal aantal dierproeven gebruikt voor ontwikkeling, productie, controle of ijking van geneesmiddelen voor mens en dier) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.2.3: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van wettelijke bepalingen bij de verschillende subdoelen in de ontwikkeling van geneesmiddelen bij mens en dier als percentage van het totaal aan dierproeven voor deze subdoelen in Nederland van 2004 tot 2008 (Zo doende 2004-2008).



Grafiek 7.2.4: Mate van ongerief in dierproeven bij de ontwikkeling, productie, controle en ijking van geneesmiddelen bij mens en dier (in % van het totale aantal dierproeven voor deze doeleinden) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

### 7.2.2 Ontwikkelingstraject geneesmiddelen

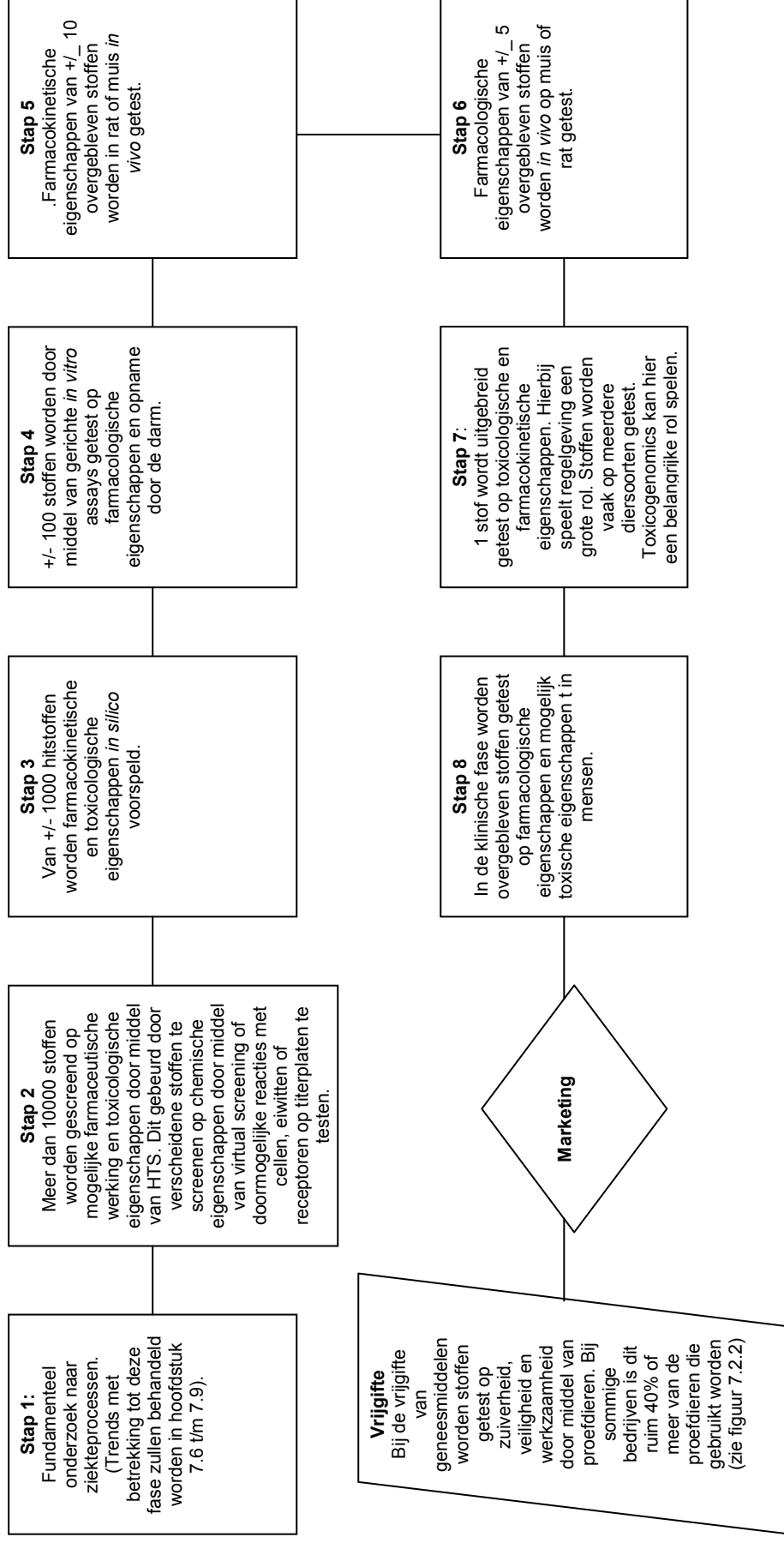
De ontwikkeling van een nieuw geneesmiddelen duurt lang. Er kan tussen het moment dat er aanwijzingen worden gevonden dat een stof aangrijpt op een ziektemechanisme tot het gebruik door patiënten wel 20 jaar tijd zitten. Er zijn verschillende stappen in het proces te onderscheiden die invloed hebben op het aantal proefdieren dat uiteindelijk gebruikt gaat worden. Daarbij probeert men strategisch te testen om zo de kosten en het proefdiergebruik zo laag mogelijk te houden. Dit kan door farmacologische, farmacokinetische en toxicologische eigenschappen eerst *in silico* en *in vitro* te testen. Een voorbeeld van hoe een ontwikkelingstraject van geneesmiddelen kan verlopen is in figuur 2 uiteengezet.<sup>189,190</sup>

---

<sup>189</sup> L Di, EH Kerns, Application of pharmaceutical profiling assays for optimization of drug-like properties. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 8, 495—504. 13

<sup>190</sup> PhRMA, 2007, drug discovery and development: understanding the R&D process, <http://www.innovation.org>, accessed aug 2009

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



Figuur 7.2: Stappen in het ontwikkelingsproces van geneesmiddelen en biologicals die van invloed kunnen zijn op het proefdiergebruik

### 7.2.3 Trends proefdiergebruik

#### *Intelligente teststrategieën*

Het toepassen van intelligente teststrategieën wordt door alle respondenten als een belangrijke trend gezien. Er is sinds de jaren 90 een flinke slag gemaakt binnen de farmaceutische industrie door verdere optimalisatie van High Throughput systemen<sup>191</sup>. Veel respondenten vinden echter dat er voornamelijk in het veiligheidsonderzoek nog veel veranderingen mogelijk zijn (zie box.7.2),<sup>192,193,194,195</sup> zoals het kritisch omgaan met de eisen voor een bepaalde compound op basis van een individuele beoordeling, een gerichte keuze van het juiste diertype of aandacht voor de resultaten uit de klinische testfase. Daarnaast zou er in sommige gevallen, bijvoorbeeld in geval van humaan specifieke monoclonale antilichamen, onder strikte condities getest kunnen worden in de mens.<sup>196</sup>

Een voorbeeld van een verbetering van een teststrategie is een verandering in reproductietoxiciteitstudies naar monoclonale antilichamen. Voor dit soort reproductietoxiciteitstudies, worden primaten gebruikt omdat primaten qua menstruele cyclus, karakteristieken van vroege zwangerschap, placenta morfologie, fysiologie, inplanting en snelheid van embryonale ontwikkeling op de mens lijken. Vooral voor het testen van eiwitachtige producten voor medicinaal gebruik op reproductie toxische eigenschappen zijn niet-humane primaten van belang

In de standaardopzet worden 4 groepen met 15 tot 20 dieren per groep gebruikt. In deze opzet krijgen een aantal drachtige vrouwtjes tussen dag 20 en 50 van de zwangerschap het antilichaam toegediend. Echter de uitwisseling tussen moeder en jong via de placenta is in die periode zeer minimaal tot volledig afwezig. Hierdoor is het risico op beschadiging door monoklonale antilichamen (afwijkingen in het skelet) erg laag. Dit maakt het minder relevant om de effecten van monoklonale antilichamen over de hele periode van de zwangerschap te onderzoeken. Alleen het latere deel van de zwangerschap is interessant waardoor er één proefgroep nodig is en minder primaten gebruikt hoeven te worden.

Beleid wordt als een belangrijke vertragende factor gezien voor vermindering van het aantal dierproeven. Volgens de respondenten komt men binnen regelgevende instanties traag tot een consensus onder andere door de verschillende culturen die in organisaties als de ICH en EMEA vertegenwoordigd zijn. Daarbij komt dat bedrijven de neiging hebben om bij nieuwe ontwikkelingen, zoals producten waar nanotechnologie een rol speelt, uitgebreider te testen met mogelijk meer *in vivo* studies dan misschien wetenschappelijk noodzakelijk is. Zeer grondig testen op veiligheid kan er toe bijdragen dat stoffen eerder worden goedgekeurd. Wanneer een soortgelijke stof vervolgens op de markt komt, vereisen de autoriteiten de uitgebreide

---

<sup>191</sup> Verboost, P.M., Van der Valk, J., Hendriksen, C.F.M, Effects of the Introduction of in vitro Assays on the use of experimental Animals in Pharmacological Research (2007), ATLA 35 :223-228

<sup>192</sup> Henck J.W. , Hilbisch K.G. Serabian M.A., Cavagnaro J. A., Hendrickx, A.G., Agnisch, N.D., Kung, A.H.C. Mordenti, J., Reproductive Toxicity Testing of Therapeutic Biotechnology Agents, 1996, Teratology 53: 185-195

<sup>193</sup> Buse E., Habermann, Osterburg, I. Korte, R. Weinbauer, G. F., reproductive/developmental toxicity and immunotoxicity assessment in the nonhuman primate, Toxicology, 2003, 185: 3: 221-227

<sup>194</sup> Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), The need for non-human primates in biomedical research production and testing of products and devices, Januari 2009

<sup>195</sup> Nele Pentsuk, Jan Willem van der Laan. An Interspecies Comparison of Placental Antibody Transfer: New Insights into Developmental Toxicity Testing of Monoclonal Antibodies. Birth Defects Research (Part B) 2009, 86: 328-344

<sup>196</sup> Muller, PY and Brennan, FR Safety Assessment and Dose Selection for First-in-Human Clinical Trials With Immunomodulatory Monoclonal Antibodies, Clinical pharmacology & Therapeutics, 2009, 85(3): 247

test procedure die zij eerder onder ogen hebben gekregen. Meer overleg in een vroegtijdig stadium tussen beleid, bedrijven en wetenschap zou dit kunnen verhelpen.

Tot slot zijn de respondenten voor een openstelling van dossiers over dead leads (stoffen die tijdens het ontwikkelingsproces zijn afgevallen). Deze informatie zou mogelijk bij de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel interessant kunnen zijn en voor vermindering van het aantal dierproeven kunnen zorgen.

### *Moeilijker om nieuwe geneesmiddelen te vinden*

De daling van het aantal dierproeven dat door bijvoorbeeld high-throughput technieken, *in silico* modellen en *in vitro* tests is bewerkstelligd wordt deels teniet gedaan doordat farmaceuten tegenwoordige meerdere ontwikkelingstrajecten parallel laten lopen om de kans te verhogen dat zij uiteindelijke nieuwe producten op de markt zetten.<sup>6</sup> De reden voor deze strategie is dat het de laatste jaren steeds moeilijker is om nieuwe werkzame stoffen te vinden. (artikel op zoeken) Men hoopt dat nieuwe ontwikkelingen als DNA banken (artikel), genomics technieken (artikel) en de zoektocht naar orphan receptoren<sup>197</sup> het vinden van nieuwe werkzame stoffen zal vergemakkelijken.

### *Ontwikkeling van geneesmiddelen voor een beperkte groep patiënten*

Er komen steeds meer groepsspecifiekere medicijnen op de markt.<sup>198</sup> Het is nog onzeker wat het beleid zal zijn met betrekking tot het veiligheidsonderzoek voor dit type geneesmiddelen die in sommige gevallen zeer vergelijkbare werkingsmechanismen zullen hebben.

### *Meer onderzoek naar het mechanisme*

Er wordt steeds meer belang gehecht aan het werkingsmechanisme van geneesmiddelen. Dit zal zowel het gebruik van *in vitro* technieken als van diermodellen intensiveren.

### *Meer langlopend onderzoek*

Men zal steeds beter in staat zijn om meer informatie uit diermodellen te halen. Ontwikkelingen die genoemd zijn die hieraan bijdragen zijn non invasieve imaging technieken, farmacogenomics en toxicogenomics. Het vinden van nieuwe biomarkers speelt daarbij een belangrijke rol. Dit heeft twee kanten. Aan de ene kant kunnen door deze technieken en benaderingen experimenten mogelijk langer duren en kan het ongerief voor het individuele dier hoger worden. Aan de andere kan de vertaling naar de mens makkelijker worden<sup>199</sup> en hoeven er minder dieren gebruikt te worden om dezelfde informatie te verkrijgen.

### *Primaten*

De meningen zijn verdeeld over het belang van primaten bij de ontwikkeling van geneesmiddelen. Sommigen achten het waarschijnlijk dat een primate voor mensspecifieke stoffen als het beste diermodel zal worden gezien. Omdat er steeds meer mensspecifieke medicijnen op de markt komen, zou dit kunnen betekenen dat primaten een grotere rol krijgen in het ontwikkelingsproces. Anderen verwachten dat eerder dat microdosing bij de mens of het gebruik van transgene dieren een mogelijke verhoging van het gebruik van primaten zal tegenhouden<sup>11</sup>.

---

<sup>197</sup> Giguire, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function, *Endocrine Reviews* 20(5): 689–725

<sup>198</sup> Rawlins, M.D., Cutting the cost of drug development? [Nat Rev Drug Discov](#), 2004 Apr;3(4):360-4

<sup>199</sup> Hanash, S., Pittery, S.J., Faca, V.M. (2008), Mining the plasma proteome for cancer biomarkers, *Nature*, Vol 452, (7187): 571-579

*Gemakkelijker vinden van literatuur*

Sommige respondenten verwachten dat het steeds gemakkelijker gaat worden om relevante literatuur te vinden over proefdiermodellen en nieuwe analysemethoden waardoor er vermindering van het aantal dierproeven kan optreden.

*Nieuwe in vitro technieken*

Door ontwikkelingen op het gebied van cellijnen, stamcellen, weefsel, *in silico* testen en genomics technieken verwacht men dat er een steeds betere screening mogelijk is voordat *in vivo* getest moet worden. Nieuwe ontwikkelingen zijn bijvoorbeeld de ontwikkeling van muizen follikels *in vitro* voor het vinden van effecten van producten op embryonale ontwikkeling en onderzoek op metabole processen door het incuberen van stoffen met levermicrosomen waarna metabole enzymen hun werk doen. Bij het gebruik van *in vitro* methoden zullen toxicogenomics, farmacogenomics technieken naar verwachting een belangrijke rol spelen<sup>200</sup>.

*Verhoging welzijn door een toenemende kennis over het proefdier*

Men verwacht dat het welzijn van proefdieren die gebruikt worden voor de ontwikkeling van geneesmiddelen zal verbeteren door meer kennis over het gedrag van verschillende diersoorten, door een verhoging van het opleidingsniveau van artikel 12 en 9, door training van dieren om test procedures minder stressvol te laten verlopen door verbeterde huisvesting.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Geneesmiddelenonderzoek

	Ongewervelden	Immuno-chemisch	Fysisch-chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefselkweek
	X	X	XX	XXX		XX	XXX	XXX

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

---

<sup>200</sup> Gunther, E.C., Stone, D.J., Gerwien, R.W., Bento, P., Heyes, M.P. Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, yr.2003 vol.100 iss.16 pg.9608

## 7.3 Toxicologisch onderzoek

### 7.3.1 Introductie

Doel van toxicologisch onderzoek is te onderzoeken in welke mate stoffen schadelijk kunnen zijn voor mens, dier en milieu. Het gaat daarbij om de schadelijkheid van gewasbeschermingsproducten, stoffen gebruikt in de industrie, in het huishouden, in cosmetica, als voedseladditieven in voeding voor mens en dier, tabakswaaren en stoffen die schadelijk kunnen zijn voor het milieu. Daarnaast bestaat een groot deel van het onderzoek ten behoeve van de ontwikkeling, productie en controle van biologische producten, geneesmiddelen en andere medische of veterinaire producten uit veiligheidsonderzoek.

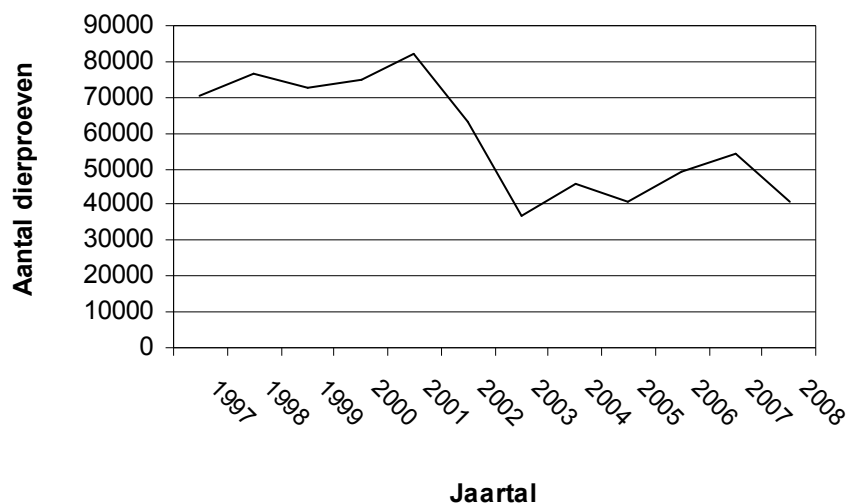
Toxicologische effecten worden over het algemeen ingedeeld naar plaats van effect. In sommige gevallen gaat het om een systemisch effect, in andere gevallen is er alleen een effect merkbaar in een bepaald orgaan. Systemische toxiciteit kan worden onderverdeeld in acute toxiciteit, subchronische toxiciteit, chronische toxiciteit, carcinogeniteit, ontwikkelingstoxiciteit, en genetische toxiciteit. Belangrijke orgaantypische toxiciteitstudies zijn: reproductietoxiciteit (schade aan geslachtorganen of ontwikkeling van embryo<sup>191</sup>), oog toxiciteit, neurotoxiciteit, niertoxiciteit, respiratoire toxiciteit, levertoxiciteit, cardiotoxiciteit en immunotoxiciteit<sup>201</sup>. Alleen voor systemische toxiciteitstudies, teratogeniteit (afwijkende ontwikkelingen van het embryo<sup>191</sup> en reproductietoxiciteit wordt in Nederland het proefdiergebruik apart geregistreerd. Grafiek 7.3.2 laat zien dat in Nederland de meeste dierproeven gedaan worden voor het reproductietoxiciteitonderzoek, het teratogeniteitonderzoek, sub-chronisch en chronisch toxiciteitonderzoek en aan het subacuut toxiciteitonderzoek.

In 2008 werd 7,1 % van het totaal aantal dierproeven uitgevoerd voor onderzoek naar de schadelijkheid van stoffen. Grafiek 7.3.1 laat zien dat er in 2002 en 2003 een sterke daling plaats vond, dit door een vermindering van het aantal buitenlandse opdrachten. Vanaf 2005 lijkt het toxicologisch onderzoek weer iets te stijgen met name door het teratogeniteitsonderzoek, gevolgd in 2008 door een daling. Grafiek 7.3.2 laat zien dat deze daling zich met name voordoet in het sub chronisch, chronisch en teratogeniteitsonderzoek (Zo doende , 2008). Respondenten geven aan dat er binnen het toxicologisch onderzoek nog geen gevolgen van de REACH wetgeving merkbaar zijn. Een stijging door de vernieuwde wetgeving zal naar verwachting later plaats vinden.

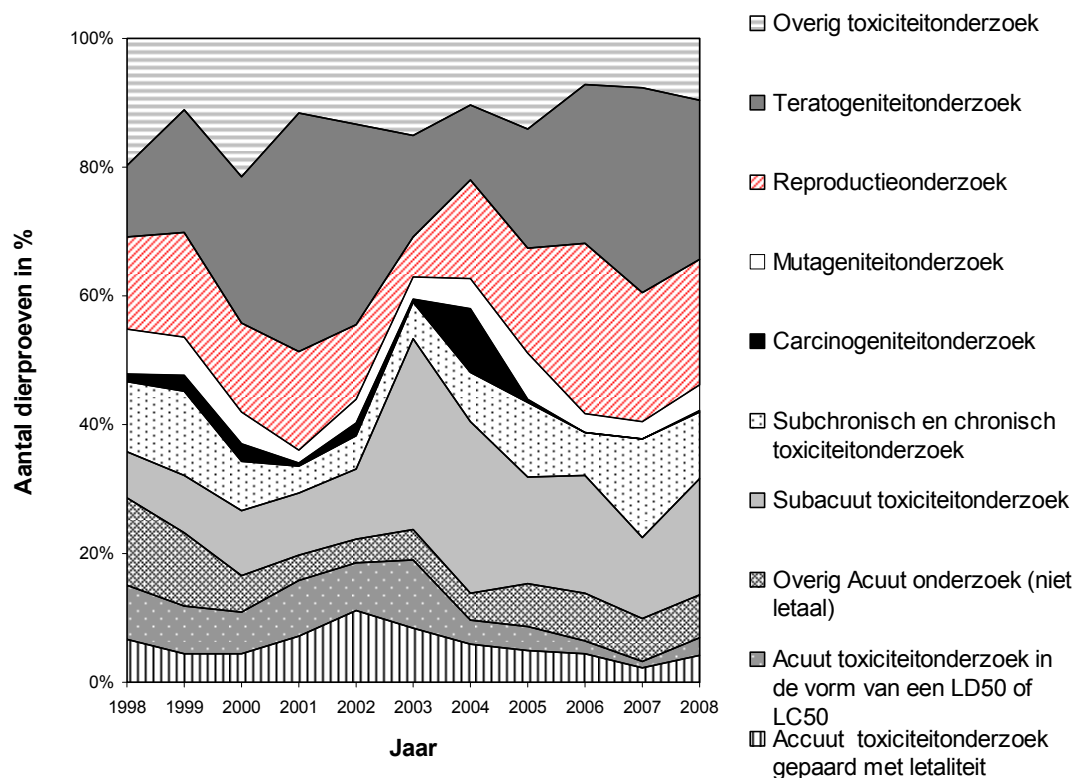
Grafiek 7.3.3 laat zien dat verreweg de meeste *in vivo* toxicologische studies worden gedaan bij het testen van de veiligheid voor stoffen gebruikt in de industrie, in de agrarische sector, stoffen gebruikt in voeding en voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.

---

<sup>201</sup> Toxicology and Environmental Health Information Program of the National Library of Medicine, U.S. Department of Health and Human Services (NLM), Toxicology tutor I, <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/toxtutor.html>, toegang 8 december 2008

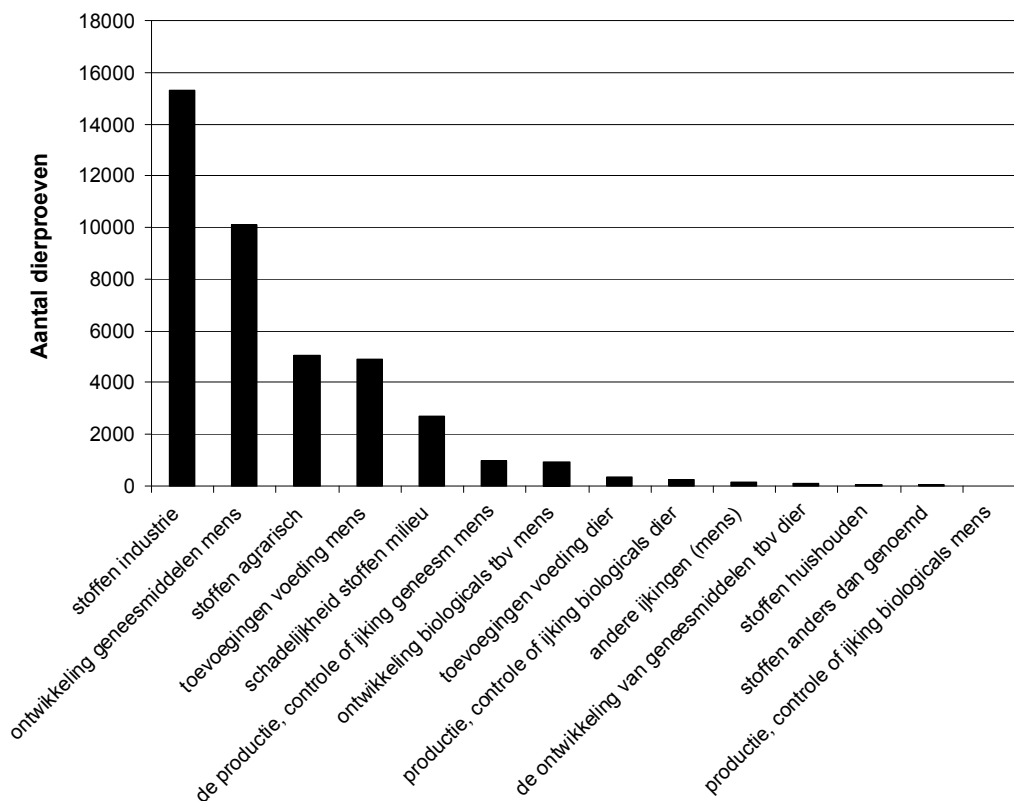


Grafiek 7.3.1: Aantal dierproeven voor toxicologisch onderzoek van in Nederland 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

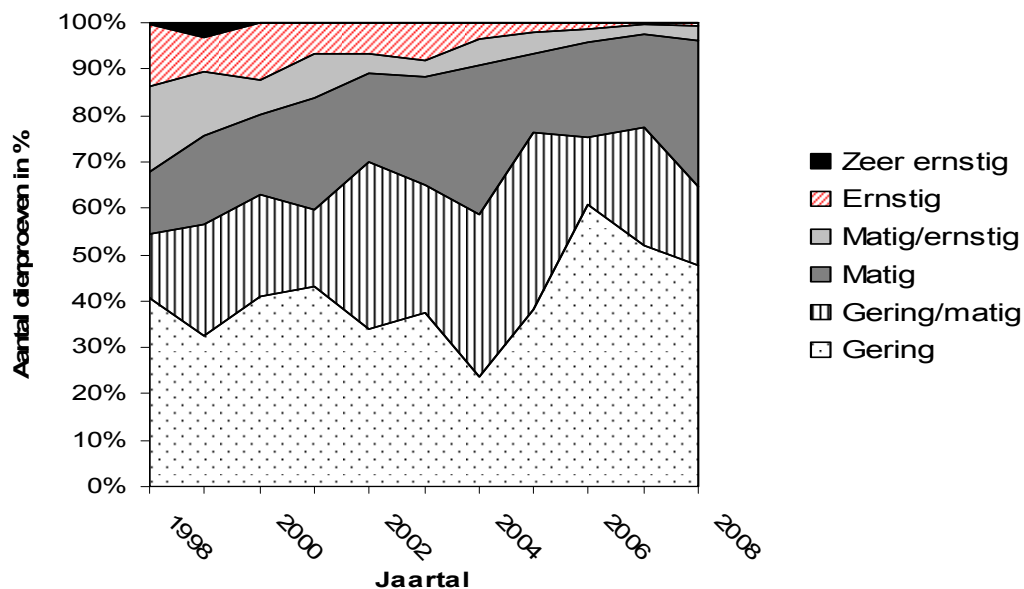


Grafiek 7.3.2: Aantal dierproeven per type toxicologisch onderzoek (in % van totaal aantal dierproeven gebruikt in toxicologisch onderzoek) van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



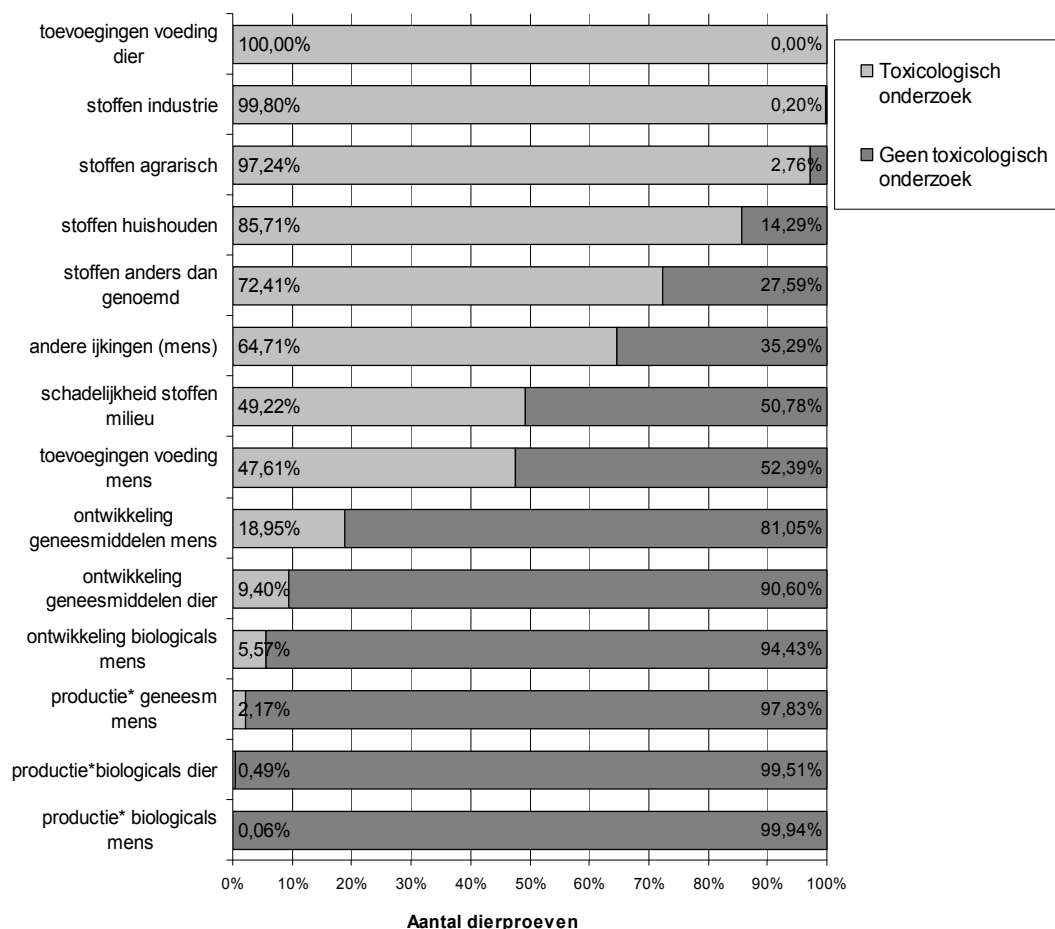
Grafiek 7.3.3: Aantal dierproeven in toxicologisch onderzoek bij de subdoelstellingen waarbij toxicologisch onderzoek van toepassing is in Nederland in 2008 (Bron: Zo doende 2008)



Grafiek 7.3.4: Mate van ongerief voor onderzoek naar de schadelijkheid van stoffen (stoffen voor gebruik in de agrarische sector, in de industrie, in het huishouden, als toevoeging in voeding voor de mens, als toevoeging in voeding voor het dier, stoffen die mogelijk schadelijk zijn in het milieu en andere stoffen)\* van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

\* Het is niet mogelijk om met de gegevens uit Zo doende de mate van ongerief voor veiligheidsonderzoek van de mate van ongerief voor andere typen onderzoek bij de andere van toepassing zijnde subdoelstellingen te

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



Grafiek 7.3.5: Percentage toxicologisch onderzoek uitgevoerd ten opzichte van ander onderzoek in dezelfde doelstelling in Nederland in 2008 (Bron Zo doende 2008; productie\* betekent productie, controle of ijking).

### 7.3.2 Gevalideerde 3V tests

Voor 3V alternatieven binnen de toxicologie bestaat een grote belangstelling, zowel wetenschappelijk als maatschappelijk. Een aantal alternatieve toxicologische tests zijn gevalideerd. Tot nu toe zijn wetenschappelijk gevalideerd: huid irritatie, fototoxiciteit, huid absorptie, genotoxiciteit/mutageniteit, en embryotoxiciteit<sup>202</sup>. Met uitzondering van embryotoxiciteit zijn deze tests opgenomen door de regelgeving. Veel problemen worden bij het volledig vervangen van tests voor acute, sub acute en chronische toxiciteit, sensibilisatie, carcinogeniteit en reproductie toxicologie.<sup>203</sup> Het gaat hierbij om systemische toxiciteit dus toxiciteit die in het hele systeem voorkomt en daardoor lastig te modelleren. Hier kunnen wel strategieën voor ontwikkeld worden die het aantal dieren sterk kunnen verminderen. Voor acute toxiciteit vroeger vastgesteld door middel van de LD50test), huid sensibilisatie zijn dan ook alleen

onderscheiden. Meer informatie over de mate van ongerief bij het totale onderzoek van de ontwikkeling, productie, controle of ijking van biologische producten en geneesmiddelen voor mens en dier is te vinden in grafiek 7.1.4 en grafiek 7.2.4.

<sup>202</sup>European Commission, Report from the commission to the Council and the European parliament Report on the Development, Validation and Legal Acceptance of Alternative Methods to Animal Tests in the Field of Cosmetics (2007) [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/cosmetics/documents/animal-testing/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/cosmetics/documents/animal-testing/index_en.htm)

<sup>203</sup>Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.g., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H., Wollin, K.M., Alternative methods to safety studies in experimental animals:role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH), Arch Toxicol (2008) 82:211–236

vermindering- en verfijningalternatieven gevalideerd en opgenomen in de wetgeving.<sup>204</sup>

### 7.3.3 Trends proefdiergebruik

#### *Verandering teststrategieën*

Het vaststellen van de schadelijkheid van stoffen omvat 4 stappen. Eerst wordt vastgelegd wat de toxische eigenschappen zijn van een stof (hazard characterisation), dan wordt gekeken wat het verband is tussen blootstelling en toxisch effect (hazard assessment), vervolgens wordt de mate van blootstelling bekeken (risk characterisation) en tot slot worden de gezondheidsrisico's voor mens, dier of milieurisico's vastgelegd (risk assessment)<sup>1205</sup>. Kennis over de toxicologische eigenschappen van een stof worden verzameld door te kijken naar effecten in de mens (epidemiologische data, klinische studies of casus studies van ongelukken met stoffen) en *in vivo* en *in vitro* tests te doen. Daarnaast wordt ondersteunende data gehaald uit *in silico* modellen bijvoorbeeld door de toxicologische data van bekende vergelijkbare chemische stoffen te gebruiken als ondersteuning voor het bepalen van een risico indicatie van de te bestuderen stof. De laatste jaren is men echter deze strategie aan het veranderen. Men probeert te testen op een manier die minder dieren kost en tijd en kosten bespaart door bij iedere stap te analyseren of verdere tests nodig zijn.<sup>206207</sup> Een centrale rol binnen deze nieuwe teststrategieën is het achterhalen van toxicologische pathways\*. Door de mechanismen te achterhalen van toxische processen hoopt men meer informatie te kunnen halen uit *in vitro* tests en zo het gebruik van *in vivo* studies sterk te verminderen.

#### *Read across*

Read across zijn *in silico* methoden waarbij men met een reeks stoffen die soortgelijke karakteristieken lijken te hebben, probeert te voorspellen of een diertest nodig is. Wanneer een bepaalde stof vergelijkbaar is bijvoorbeeld qua chemische structuur met een andere bekende stof, kan er besloten worden om de betreffende stof niet meer te testen. Hoe meer stoffen bekend zijn en opgenomen worden in databases hoe groter de voorspellende waarde wordt van Read across methoden. Een voorbeeld van een read across methoden zijn QSARs. Bij QSAR wordt aan de hand van de fysisch-chemische eigenschappen van een stof een kwantitatieve relatie gelegd tussen structuur en biologische activiteit. De respondenten geven aan dat de mogelijkheden van QSAR nu nog beperkt zijn en alleen een eerste high through put screening kan opleveren.<sup>208</sup>

#### *Orgaanculturen (humaan en dierlijk)*

Een orgaancultuur is het 'in kweek brengen' van vers verkregen weefsel waarin meerdere celtypen aanwezig zijn. Het voordeel van deze weefsels ten opzichte van bijvoorbeeld cellijnen is dat interacties tussen verschillende celtypen meegenomen kunnen worden. Nadeel is de beperkte levensduur (niet langer dan 4 dagen). Voor

---

<sup>204</sup> Pauwels, M., Rogies, V. EU legislations affecting safety data availability of cosmetic ingredients, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49 (2007) 308-315

<sup>205</sup> Gezondheidsraad, 2001, Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering, U2260/ES/mj/442-B3

<sup>206</sup> National Research Council. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. (2007) National Research Council Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, The National Academies Press, Washington, DC. Available at: [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=11970](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11970). toegang September 2009.

<sup>207</sup> Hartung, T (2009). "A Toxicology for the 21<sup>st</sup> Century—Mapping the Road Ahead." *Toxic.Sci.*109(1):18-23

\* Toxicologische pathways zijn cellulaire processen die in gang worden gezet bij een blootstelling aan een toxische stof.

<sup>208</sup> BarrattU, M.D., Integrating computer prediction systems with in vitro methods towards a better understanding of toxicology, *Toxicology Letters* 102-103 (1998).617-621

een optimale translatie van *in vitro* systeem naar de mens en voor een optimale vermindering van het aantal dierproeven heeft humaan weefsel de voorkeur. Echter de beschikbaarheid van humaan weefsel is beperkt door ethische en juridische barrières. Daarnaast kan de grote variëteit van weefsel van patiënten belemmerend werken en kan het een nadeel zijn dat dit weefsel afwijkingen kan vertonen (bijvoorbeeld weefsel van een patiënt). Ook het gebruik van weefsels van proefdieren kunnen voor een sterke vermindering zorgen. Met één proefdier kunnen verschillende slices gemaakt worden waarop meerdere tests gedaan kunnen worden<sup>209,210</sup>. Technieken als cryopreservatie kunnen een uitkomst bieden bij het gebruik van weefsel omdat deze er voor kunnen zorgen dat het weefsel opgeslagen kan worden (zie ook Hfst 5.4.9.3).

### *Tissue engineering*

Men is steeds beter in staat om meerdere typen primaire cellen in kweek te brengen (co-culturen). Zo kunnen 2D en zelfs 3D celculturen opgekweekt worden. Uit olieproducten worden polymeren gemaakt die biocompatibel zijn en afbreekbaar. Cellen kunnen hier aan hechten en kunnen geometrische systemen zoals vaatjes gemaakt worden<sup>211</sup>.

### *Stamcelonderzoek*

Een belangrijke ontwikkeling is stamcel onderzoek met daarbij onder andere het gebruik van embryonale stamcellen. Men probeert deze cellen te differentiëren naar relevante celtypen<sup>212</sup>. Stamcellen hebben zoals alle cellijnen het voordeel dat het om gezond weefsel gaat en de variabiliteit zo laag mogelijk gehouden kan worden. Ten opzichte van andere cellijnen hebben stamcellen als voordeel dat men veel materiaal in handen heeft omdat stamcellen in leven gehouden kunnen worden en naar verschillende celtypen gedifferentieerd kunnen worden. Het sturen van de moleculaire functie van cellen naar een bepaald celtype is nog een grote uitdaging. Meer kennis over epigenetica waarbij gekeken worden hoe een bepaalde genexpressie wordt getriggerd en de differentiatie van een cel stuurt speelt hierbij een belangrijke rol<sup>213</sup>.

### *Mechanische simulaties van organische systemen*

---

<sup>209</sup> Vickers, A.E. M., Fisher, R.L. Organ slices for the evaluation of human drug toxicity, *Chemico-Biological Interactions* 150 (2004) 87–96

<sup>210</sup> Parrish, A.R., Gandolfi, A.J. and Brendel, K Minireview precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology, *Life Sciences*, 1995, Vol. 57, No. 21, pp. 1887-1901,

<sup>211</sup> Prestwich, G.D., Liu, Y, Yu, B., Shu, X.Z., Scott A. 3-D culture in synthetic extracellular matrices: New tissue models for drug toxicology and cancer drug discovery, *Advan. Enzyme Regul.* 47 (2007) 196–207

<sup>212</sup> Davila J., Cezar G.G., Thiede M., Strom S., Miki T. and Trosko J. REVIEW: Use and Application of Stem Cells in Toxicology, *Toxicological Sciences* 79, 214–223 (2004)

<sup>213</sup> Uitleg van epigenetische modificatie: De celkern bevat nucleosomen. Die nucleosomen, de bouwstenen van het chromosoom, zorgen er voor dat het DNA in een compacte vorm kan worden opgevouwen. De nucleosomen bevatten een histonenkern waar DNA omheen gewonden is. Wanneer er op de aminozuren van de histonen acetylatie plaats vindt, het hechten van een acetylgroep aan de histonstaart door middel van een enzym, dan kan het nucleosoom open staan en kunnen de transcriptiefactoren binnen dringen en er voor zorgen dat de juiste stukken DNA afgelezen worden. Wanneer de acetylgroep weer verwijderd wordt dan gaat het nucleosoom terug naar zijn compacte vorm. Als het nucleosoom constant in deze compacte vorm blijft, dan kan de cel alleen maar prolifereren en is hij niet functioneel. Bij cellen in cultuur blijft het nucleosoom constant in zijn compacte vorm. Echter dit proces kan men manipuleren door de nucleosoom structuur te modificeren door middel van acetylatie. Naast acetylatie kan ook epigenetische modificatie plaats vinden door middel van andere processen zoals methylatie. Ook kanker medicijnen werken zo. De tumorcellen worden door middel van epigenetische modificatie met inhibitoren in een gedifferentieerde toestand gehouden. Hetzelfde kan gedaan worden met celculturen (waarbij de cellen vaak naar een proliferatie toestand terug gaan en hun functionaliteit verliezen) door middel van histonen-deacetylase inhibitoren. ([http://www.researchportal.be/project/ontwikkeling-van-functionele-en-stabiele-hepacytenculturen-inzetbaar-in-geneesmiddelenonderzoek-via-epigenetische-modificatiemechanismen--\(VUB\\_100000000019494\)/](http://www.researchportal.be/project/ontwikkeling-van-functionele-en-stabiele-hepacytenculturen-inzetbaar-in-geneesmiddelenonderzoek-via-epigenetische-modificatiemechanismen--(VUB_100000000019494)/))

Mechanische simulaties van bepaalde delen van de mens is een andere trend binnen de 3V alternatieven die genoemd wordt in verband met toxicologie. Zo is binnen TNO het TIM model gemaakt dat het maagdarmkanaal van de mens probeert te simuleren met behulp van enzymen en micro-organismen in een buizenstelsel<sup>214</sup>. Andere modellen brengen verschillende celculturen in compartimenten met elkaar in verbinding door vloeistof te laten lopen tussen deze compartimenten.

### *Genomics en systemsbiology*

Een belangrijke ontwikkeling die genoemd wordt door de respondenten bij het vaststellen van toxicologische pathways is genomics. Genomics zou bijvoorbeeld een grote rol kunnen spelen bij het vaststellen van carcinogene effecten. Met behulp van systemsbiology kan de relatie gevonden worden tussen verschillende pathways in het organisme door deze in kaart te brengen en de interactie te modelleren m.b.v. computer modellen<sup>215216</sup>. Die kennis vergemakkelijkt de ontwikkeling van 3V alternatieven.

### *Fysisch-chemisch modellen*

PBBK is gebaseerd op het integreren van gegevens uit *in vitro* onderzoek met kinetische parameters uit de fysiologie. Aspecten hierbij zijn de verdeling van stoffen over bloed en weefsel, de bloedstroom, de fysisch-chemische eigenschappen van de stof en de verdeling bloed tussen de verschillende lichaamscomponenten. Op deze wijze kan beschreven worden hoe stoffen worden opgenomen uit het maagdarmkanaal en in welke concentratie stoffen in verschillende weefselcompartimenten voorkomen. Hiermee kan voorspeld worden welke dosis, op welk tijdstip in verschillende delen van het lichaam aanwezig zal zijn<sup>217</sup>.

### *Microdosing*

Tot slot wordt microdosing genoemd als trend. Hierbij wordt een kleine hoeveelheid stof (vaak een geneesmiddel), ver onder de toxische dosis, toegediend aan een vrijwilliger.. Microdosing wordt vooral gebruikt om informatie te verzamelen over de kinetiek van de stof (vaak een farmacon) in het lichaam. Een beperking van microdosing is dat de farmacokinetiek van de stof verandert vanwege de microdosis en de voorspellende waarde van het onderzoek daardoor vermindert<sup>218219</sup>.

### *Groter belang van onderzoek met vissen*

Volgens de respondenten wordt in het toxicologisch onderzoek vaker de vis als proefdier gebruikt. Met name de Zebravis wordt als een interessant proefdier gezien, vanwege zijn grootte, het bekend zijn van het genoom van de Zebravis, en doordat de ontwikkeling van zebravis embryo's goed gevolgd kan worden doordat deze doorzichtig zijn<sup>220221</sup>.

---

<sup>214</sup> Déat E., Blanquet-Diot S., Jarrige J.-F., Denis S., Beyssac E., Alric M., Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: Application tot he assessment of lycopene and  $\alpha$ -tocopherol bioavailibility from a whole food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(23): 11314-11320

<sup>215</sup> Kroeger, M. How omics technologies can contribute to the 3R principles by introducing new strategies in animal testing, *Trends in Biotechnology*, Vol 24(8)346-343

<sup>216</sup> Slikker, W., Paule M.G., Wright, L.K.M., Patterson, T.A. and Wang, C., REVIEW: Systems biology approaches for toxicology, *J. Appl. Toxicol.* 2007; 27: 201–217

<sup>217</sup> Clewey H. J. Anders M.E., Blaauboer, B. J., On the incorporation of chemical specific information in riskassessment, *Toxicology Letters* 180 (2008) 100–10

<sup>218</sup> Lappin, G., Garner R.C. Big physics, small doses: the use of AMS and PET in human microdosing of development drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 233-240 (March 2003)

<sup>219</sup> Muller P.Y., Brennan R.R., Safety Assessment and Dose Selection for first-in Human Clinical Trials With Immunomodulatory Monoclonal Antibodies, *Clinical pharmacology & Therapeutics* (2009) 85(3)

<sup>220</sup> Hill, A.J., Teraoka, et al. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for investigating Chemical Toxicity, *Toxico.Sci* 86(1): 6-19

### *Verfijning van proeven*

Het ongerief wat de dieren ondervinden, hangt af van de typen stoffen die getest worden. De respondenten verwachten dat vooral meer eisen die gesteld worden aan de huisvesting en kooiverrijking voor verfijning kunnen zorgen. Nieuwe producten komen hier voor op de markt. Trends met betrekking tot huisvesting worden geïnitieerd vanuit het veld, maar ook door de regelgeving. Zo zijn in Europa de huisvestingseisen onlangs aangescherpt (Appendix A van de Europese Conventie ETS123). Tot slot worden real-time monitoring systemen als telemetrie genoemd als een belangrijk verfijnende techniek omdat hierdoor eerder in het toxische proces eindpunten kunnen worden vastgesteld.

### *Veranderende wetgeving*

Een andere vaakgenoemde impuls aan 3V ontwikkelingen in het toxicologisch onderzoek is de cosmetica richtlijn<sup>222</sup>. Deze stelt een verbod voor op het *in vivo* testen van ingrediënten van cosmetische producten. Hoewel in Nederland in de Wod al in 1997 is opgenomen dat cosmetica niet mogen worden getest in proefdieren<sup>223</sup> en in Europa slechts 0,1 % van het totaal aantal dierproeven werd verricht in ten behoeve van cosmetica, wordt de cosmetica wetgeving toch gezien als een belangrijke trend met betrekking tot dierproeven. De nieuwe wetgeving heeft vooral geleid tot druk bij de industrie om vervangingsalternatieven te ontwikkelen.

Verder wordt de Europese verordening (nr. 1907/2006) inzake van REACH genoemd als een belangrijke verandering binnen de wetgeving die van invloed is op het aantal dierproeven. Hoewel door veel geïnterviewden wordt aangegeven dat REACH zal leiden tot een verhoging in het proefdiergebruik<sup>224</sup> wordt door sommigen van hen REACH echter ook gezien als een beleid die op termijn grote invloed kan hebben op een belangrijkere plaats van 3V alternatieven in de regulatoire risico beoordeling van stoffen<sup>225226</sup>.

### *Gereserveerdheid van autoriteiten met betrekking tot 3V alternatieven*

Volgens toxicologen is het onzeker of autoriteiten overtuigd kunnen worden van de validiteit van andere alternatieve teststrategieën. Het duurt lang voordat nieuwe teststrategieën geaccepteerd worden. Conservatisme bij de autoriteiten om nieuwe testmethoden te accepteren, kan de prikkel bij bedrijven wegnemen om te investeren in 3V alternatieven. Daarbij wordt door de respondenten aangegeven dat een te snelle implementatie van nog niet gevalideerde tests voorkomen moet worden.

### Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Toxicologisch onderzoek

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
	XX		XX	XXX	X	X	XXX	XXX

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

<sup>221</sup> Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E. Luckenbach, T. Voelker, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing, *Environ Sci Pollut Res* (2008) 15:394–404

<sup>222</sup> Pauwels, M, Rogiers, V, EU legislations affecting safety data availability of cosmetic ingredients, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49 (2007) 308-315

<sup>223</sup> VWA, Zodoende 1997

<sup>224</sup> Hartung T & Rovida C. Chemical regulators have overreached. *Nature* Vol.460, 27 August 2009, pp. 1080-1081

<sup>225</sup> Pedersen, F et al. Assessment of additional testing needs under REACH. European Commission, Joint Research Centre, (2003) Report EUR 20863 EN.

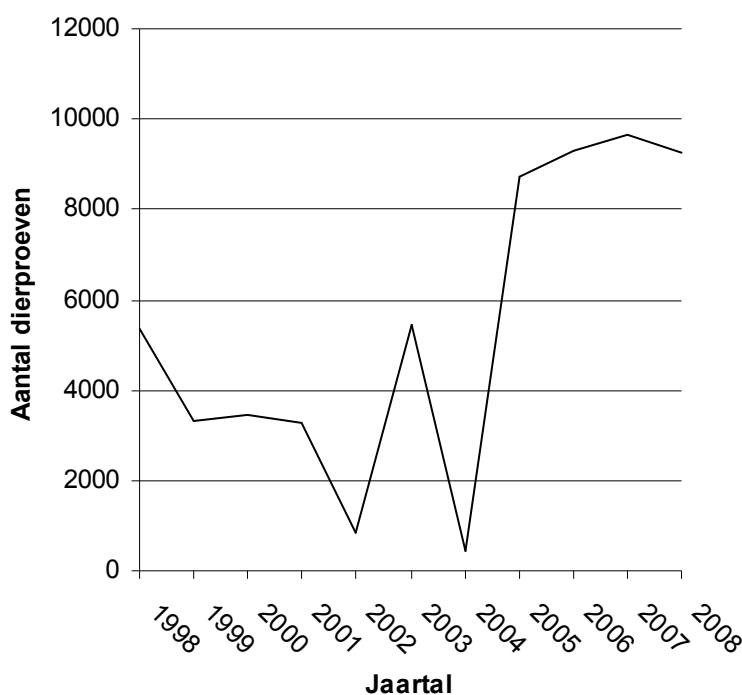
<sup>226</sup> Schaafsma, G Kroese, ED Tielemans, E , Van de Sandt, JJM , Van Leeuwen, CJ, REACH, non-testing approaches and the urgent need for a change in mind set, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 53, 1: 70-80

## 7.4 Diagnostiek

### 7.4.1 Introductie

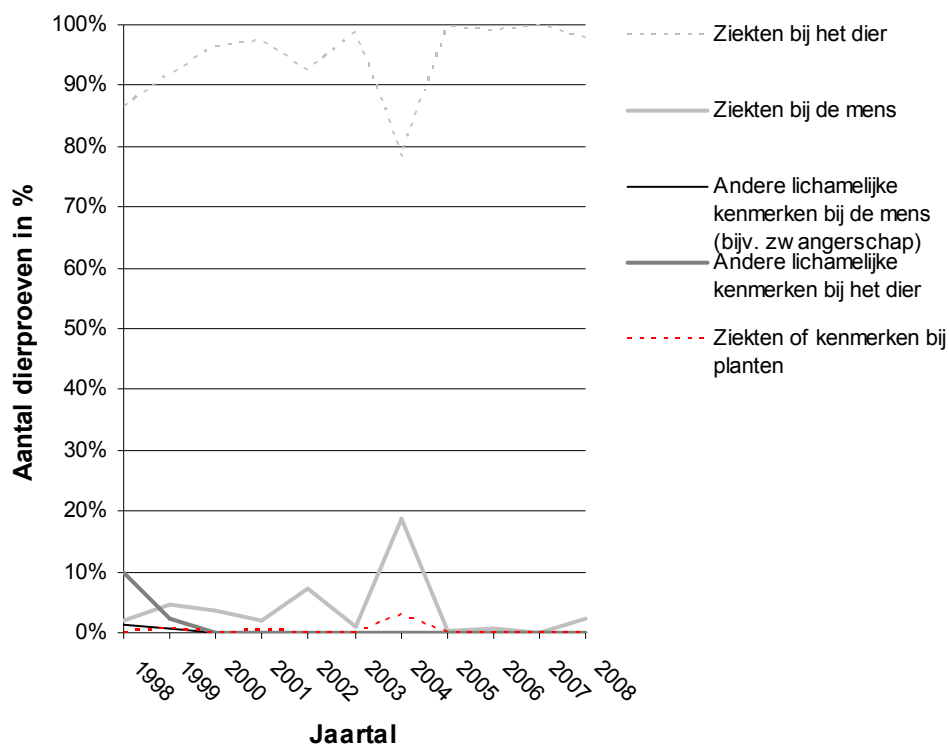
Onder diagnostiek wordt het herkennen of opsporen van ziekten of andere kenmerken bij mens, dier, of plant verstaan. De statistieken laten zien dat verreweg de meeste dierproeven binnen het toepassingsgebied Diagnostiek worden uitgevoerd voor ziekten bij dieren (Grafiek 7.4.1). Belangrijkste vraagstelling in deze subdoelstelling is het onderzoek op besmettingen met botulisme veroorzaakt door *Clostridium botulinum* in watervogels (vooral in warme zomers) of in voedingsmiddelen. Een andere vraagstelling is onderzoek op marine toxinen in schelpdieren. Voor de detectie van andere kenmerken bij mens of dier zijn de laatste jaren geen dierproeven gedaan. Vroeger bestond deze subdoelstelling vooral uit het vaststellen van zwangerschap door middel van de kikkertest. Tegenwoordig wordt hiervoor een immunologische test op het humaan gonadotrofine hormoon in de urine gebruikt. Voor de subdoelstelling het herkennen en opsporen van ziekten bij planten worden enkele dierproeven per jaar verricht. Dit gaat om de antiserum productie in konijnen voor de detectie van plantenvirussen. Dierproeven ten behoeve van ziekte bij de mens was in het verleden een belangrijke categorie. Onderzoek gebeurde voornamelijk voor de diagnostiek van tuberculose, veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*. In het verleden gebeurde dit door sputummonsters van de mens in te spuiten in cavia's. Deze test is bijna geheel vervangen door kweek op voedingsbodems en door PCR.

De aantallen dierproeven die gedaan worden voor diagnostiek van ziekten bij dieren fluctueren (Grafiek 7.4.2) doordat deze afhankelijk zijn van de uitbraak van ziekten. De stijging van het aantal dierproeven voor diagnostische doeleinden van de laatste jaren is volgens de dierproefregistratie het gevolg van besmettingen met botulisme door warme zomers (Zo doende 2005-2008)

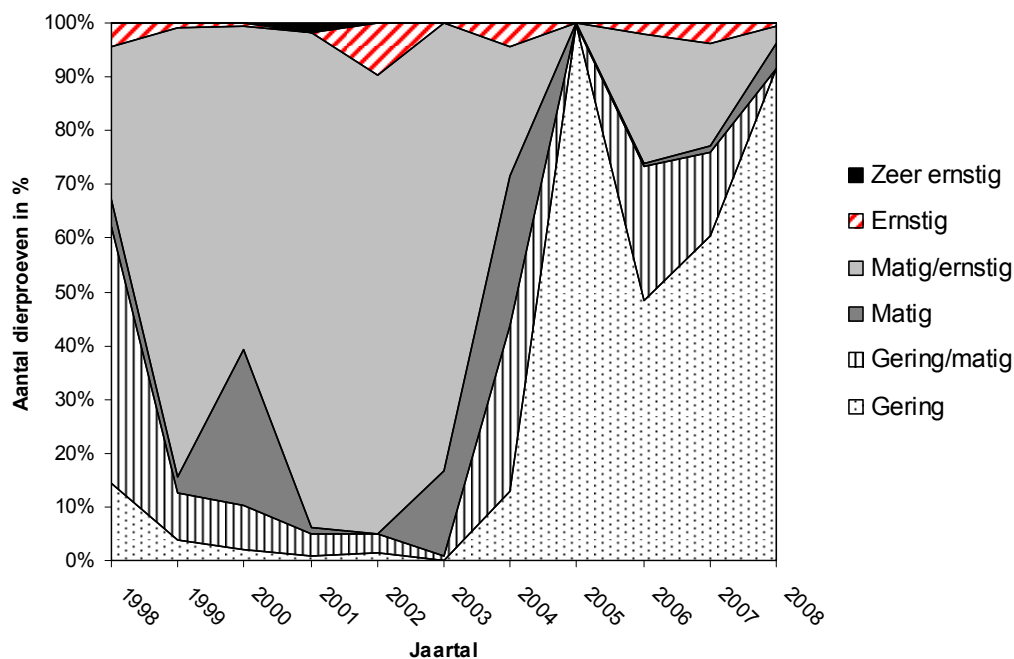


Grafiek 7.4.1: Aantal dierproeven uitgevoerd voor diagnostiek in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



Grafiek 7.4.2: Aantal dierproeven per subdoelstelling van diagnostiek (in % van het totaal binnen diagnostiek) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.4.3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van diagnostisch onderzoek (in % van totaal binnen diagnostiek) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

#### 7.4.2 Diagnostiek van ziekten

Bij de diagnostiek van ziekten wordt tegenwoordig gebruik gemaakt van immunoassays als ELISA, amplificatie technieken waarbij kleine hoeveelheden moleculen kunnen worden vermenigvuldigd en zichtbaar worden gemaakt (bijvoorbeeld polymere chain reaction en ligase chain reaction technieken) en technieken gebaseerd op het snel sequensen van het hele genoom van een virus (bijvoorbeeld DNA chips of microarrays). Iedere nieuwe techniek heeft zijn eigen praktische voordelen of tekortkomingen<sup>227, 228</sup> (Garzio de Lomaz et al., 1997; Belak et al, 2009), maar door middel van verbetering van technieken worden zij steeds sneller, handzamer, gevoeliger en specifiek.

Nanotechnologie speelt een steeds grotere rol bij diagnostische doeleinden<sup>229</sup> (Scott, 2007). Zo kunnen nanodeeltjes verbonden zijn aan antilichamen. Wanneer zij binden aan een antigen van een pathogeen, geven zij een signaal af<sup>230</sup>. Ook kan door middel van nanotechnologie één molecuul RNA of DNA gedetecteerd worden, waardoor de amplificatie stap van RNA moleculen bij normale PCR methoden kan worden overgeslagen.

Andere potentieel interessante technieken zijn de LUMINEX xmap techniek. Bij de LUMINEX xmap technologie worden microbolletjes gebruikt met ieder verschillende oppervlakte receptoren zoals antilichamen, oligonucleotiden of andere eiwitten. Bij binding geeft ieder microbolletje een uniek spectrum af wat gedetecteerd wordt in een detectie kamer. Doordat er meerdere bolletjes, ieder met hun unieke combinatie van bindingsmoleculen op het oppervlakte, gebruikt kunnen worden, kunnen verschillende pathogenen op verschillende eigenschappen (immunochemisch of genexpressie) tegelijk gedetecteerd worden<sup>231</sup> (<http://www.luminexcorp.com/>).

Zoals hierboven beschreven worden verreweg de meeste dierproeven gebruikt voor de diagnostiek van botulisme. Botulisme ontstaat door de spoorvormende bacterie *Clostridium Botulinum*. Van deze bacterie bestaan verschillende typen waarvan sommige ook botulisme verschijnselen bij de mens veroorzaken bijvoorbeeld bij infectie in een wond, bij infectie van de darmen (met name bij zuigelingen) of bij contaminatie van voeding. De bacteriën produceren verschillende typen neurotoxin. Botulinum neurotoxin kan in zeer lage dosis dodelijke verlamingsverschijnselen veroorzaken<sup>232</sup>, afhankelijk van het type ook bij de mens. Moeilijkheid bij de diagnostiek van botulisme is de het feit dat de virulentie niet wordt veroorzaakt door het micro-organisme zelf maar door het toxine. Hierdoor werken assays die het micro-organisme detecteren niet afdoende. Daarnaast vormt de zeer lage, en dus moeilijk te detecteren, dosis waarop botulinum neurotoxin schadelijke effecten heeft een probleem<sup>233</sup>. Tot slot bestaan er geactiveerde variaties van het toxine en geïnactiveerde variaties. De laatste groep kunnen bij immunologische methoden vals positieven geven<sup>6</sup> (Lidstrom and Korkeala et al., 2006). Standaard methode om botulisme te diagnosticeren is de muisassay. Hierbij worden muizen ingespoten met

---

<sup>227</sup> Garci-De-Lomas J.M.D. and Navarro D.M.D., (1997) New directions in diagnostics, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 16(3) Supplement 1, pp S43-S48

<sup>228</sup> Belák S., Kiss I., Viljoen G.J., New developments in the diagnosis of avian influenza, *Rev.sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2009, 28(1), 233-243

<sup>229</sup> Scott N.R. Nanoscience in Veterinary Medicine, *Veterinary Research Communication*, 31 (Suppl. 1) (2007) 139-144

<sup>230</sup> Fu J., Park B., Siragusa G., Jones L., Tripp R., Zhao Y., Cho Y-J., An Au/Si hetero-nanorod –based biosensor for *Salmonella* detection, *Nanotechnology* 19 (2008)

<sup>231</sup> [www.luminexcorp.com](http://www.luminexcorp.com), accessed 16 december 2009

<sup>232</sup> Lindström M., Korkeala H., Laboratory diagnostics of botulism, *Clinical Microbiology Reviews*, (2006) 19(2) 298-314

<sup>233</sup> Cai S., Singh B.R., Botulism Diagnostics: From Clinical Symptoms to *in vitro* Assays, *Critical Reviews in Microbiology* (2007) 33:109-126

mogelijk geïnfecteerd materiaal. Om vervolgens het type neurotoxin te achterhalen, worden muizen ingespoten met een antitoxine die specifiek is voor een van de typen botulinum neurotoxin, waarna zij vervolgens worden geïnfecteerd met het besmette materiaal.

Huidige technieken voor de detectie van botulinum neurotoxin, zoals neurotoxin specifieke polyclonale antilichamen, en mass spectrometry zijn niet specifiek genoeg met name wanneer de toxinen gemeten moeten worden in een bloed of weefselmonster. Technieken die volgens de literatuur mogelijk in de toekomst uitkomst gaan bieden, zijn eiwit micro arrays, LUMINEX xmaptechnologie en rolling circle amplification waarbij proteïnen uit een sample vermeerderd kunnen worden.

Mariene toxinen worden geproduceerd door specifieke soorten algen (flagellaten). Omdat schelpdieren grote hoeveelheden water filteren hopen de marine toxinen zich op in deze dieren. Consumptie van deze schelpdieren kan bij de mens tot ernstige vergiftigingsverschijnselen leiden, afhankelijk van het toxine variërend van diarree tot neurologische verschijnselen als paralyse. Onderzoek op mariene toxine bij schelpdieren vindt plaats en is wettelijk verplicht als grootschalige groei van algen geconstateerd wordt. Voor het onderzoek op mariene toxinen zijn, afhankelijk van het toxine, muis- of ratten bioassays voorgeschreven, Voor deze bioassays zijn vervangingsalternatieven ontwikkeld<sup>234</sup>, vooral op basis van High Performance Liquid Chromatografie (HPLC). Acceptatie van deze methoden wordt opgehouden door het ontbreken van goede referentie preparaten<sup>235</sup>.

Geïnterviewden geven aan dat met name voor het vaststellen van de mate van virulentie en de mechanismen achter de schadelijke werking van ziekteverwekkers dierproeven nodig zijn. Bij het vaststellen van de virulentie van een ziektekiem is een moeilijkheid dat de virulentie veroorzaakt wordt in interactie met de gastheer van het pathogeen. Hierdoor is zowel de genetische opmaak van het pathogeen als de genetische opmaak van de gastheer van belang voor het vaststellen van de virulentie. Dit bemoeilijkt het ontwikkelen van vervangende methoden. Ook bemoeilijkt dit de uitwisseling van gegevens tussen verschillende landen, want een veestapel in bijvoorbeeld Frankrijk heeft een net iets andere genetische opmaak als een veestapel in Nederland. Een ander aspect waarvoor dierexperimenten gebruikt worden, is de ontwikkeling van nieuwe diagnostische tests. Deze moeten gevalideerd worden door middel van dierproeven. Ontwikkelingen in de moleculaire biologie zullen naar verwachting bijdragen aan 3V alternatieven bij diagnostiek .

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven in Diagnostiek

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
		XXX	XX				XX	

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

<sup>234</sup> Hess P, Grune B, Anderson DB, et al. (2006). Three Rs Approaches in Marine Biotxin Testing. The Report and Recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54). *Altern.Lab.Anim.* 34(2): 193-224.

<sup>235</sup> Guy AL, Griffin G. (2009). Adopting alternatives for the regulatory monitoring of shellfish for paralytic shellfish poisoning in Canada: Interface between federal regulators, science and ethics. *Regul.ToxicolPharmacol.* 256-263.

## 7.5 Onderwijs en training

### 7.5.1 Karakteristieken proefdiergebruik

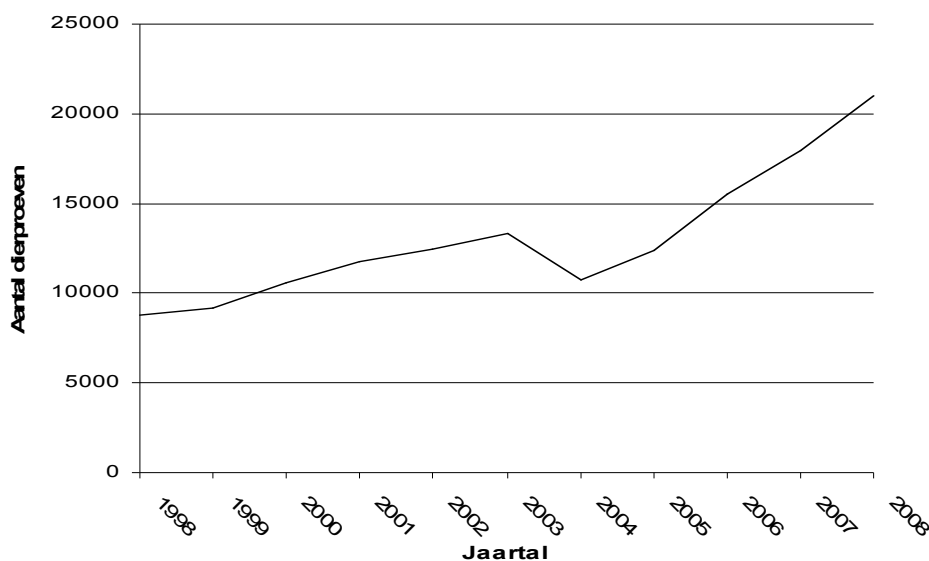
In tegenstelling tot sommige andere landen worden in Nederland geen proeven met dieren uitgevoerd op lagere en middelbare scholen. Anders ligt het voor academisch onderwijs en specifieke beroepsopleidingen (art.12) en postacademische opleidingen. In 2008 werden 21010 dierexperimenten gedaan (3, 63 % van het totaal) ten behoeve van het onderwijs in Nederland.

In tegenstelling tot het totale aantal dierproeven laten de aantallen dierproeven voor het onderwijs een lichte toename zien. Door de relatief lage aantallen hebben kleine veranderingen toch een groot effect op de statistieken, zoals 2007 liet zien. Een aanpassing in registratiecriteria voor wat betreft het herhaald hergebruik van dieren voor onderwijsdoeleinden resulteerde in een schijnbare stijging van aantal dierproeven voor dit doel. Overigens blijkt uit de statistieken niet wat de oorzaak van de stijging in de laatste jaren is. Aantallen dierproeven in het onderwijs zijn o.a. afhankelijk van het totale aantal studenten binnen een biomedische opleiding van een jaar, aangepast curriculum, aangepast onderwijs, gebruik van alternatieven, aangepaste registratie, etc. en het is moeilijk aan te geven welk (of welk complex) van deze factoren aan de stijging ten grondslag ligt.

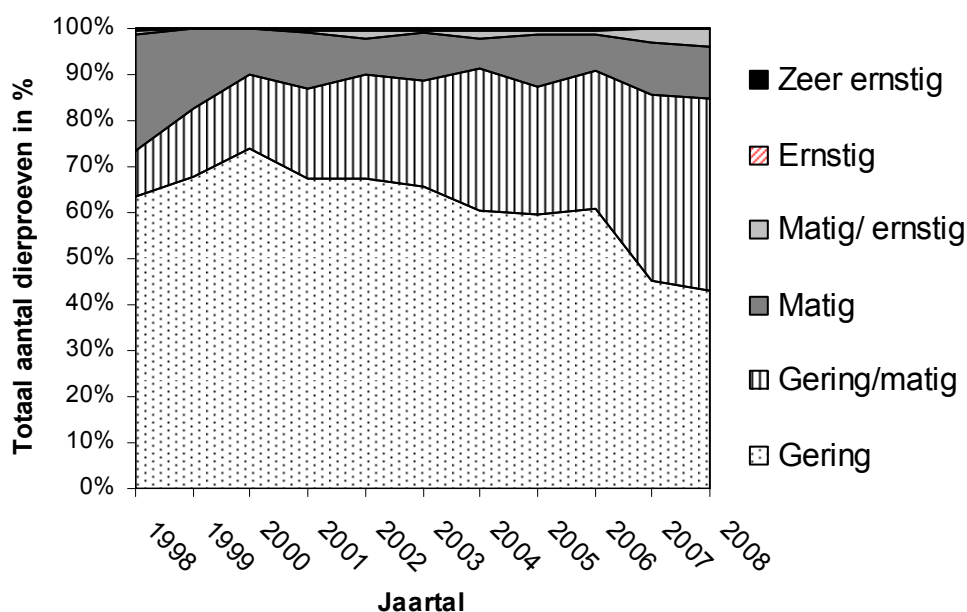
Meer dan 30% van de onderwijsdieren wordt hergebruikt. Het gaat dan om proeven met gering ongerief. Voor 2008 is het geschatte ongerief als volgt: gering (43%), gering-matig (42%), matig (12%), matig-ernstig (4%), en ernstig (0%). 75% van de onderwijsdieren zijn knaagdieren (vnl. ratten en muizen).

De aantallen dierproeven geregistreerd voor onderwijs voor Nederlandse en Europese statistiek verschillen (21010 tegenover 14331 respectievelijk). Dit heeft twee oorzaken:

- Nederlandse statistiek omvat dierproeven en geen proefdieren (hergebruik verhoogt het aantal dierproeven);
- in de Nederlandse statistiek wordt het doden van dieren vóór een ingreep, bijvoorbeeld ten behoeve van anatomieonderwijs geregistreerd terwijl dit in de Europese statistiek niet wordt geregistreerd.



Grafiek 7.5.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderwijs en training in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.5.2: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderwijs en training (aantal dierproeven als % van totaal voor diagnostiek) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Zo werd in Nederland in 2007, 17.938 dierproeven uitgevoerd met 12.118 proefdieren (10.795 uit EU registratie<sup>236</sup> plus 1.323 gedood zonder voorgaande handeling). Van de 12.118 proefdieren worden er 5.897 meer dan eenmaal gebruikt in 2007. De registratie kent echter diverse variabelen die het moeilijk maken dierproeven in het onderwijs goed te registreren. Het is bijvoorbeeld niet altijd duidelijk of dieren die meerdere malen worden gehanteerd tijdens een practicum als één dierproef of meerdere moeten worden gerekend. Ook zieke dieren (patiënten) die in een kliniek worden behandeld door studenten in het kader van hun veterinaire opleiding kunnen als onderwijsdieren worden meegeteld.

Hoewel precieze gegevens niet beschikbaar zijn, worden de meeste dieren niet speciaal voor het onderwijs gefokt. Over het algemeen worden hiervoor zogenaamde surplus dieren gebruikt, dat wil zeggen dieren die overtollig of genetisch ongeschikt zijn voor het onderzoek.

Dierexperimenteel onderzoek ten behoeve van onderwijs wordt categoriaal getoetst door een DEC beroepsonderwijs Nederland (DEC-BON). De ervaring leert dat bij de DEC aangeboden onderwijsprotocollen niet altijd makkelijk te beoordelen zijn omdat diverse leerdoelen worden opgevoerd die eigenlijk alleen op hun waarde te schatten zijn als een heel curriculum onder de loep zou worden genomen.

Proefdiergebruik voor onderwijs en trainingsdoeleinen valt middels art.1 van de Wod onder de categorie van dierexperimenten. Dit geldt ook voor de Europese Conventie van de Raad van Europa. De huidige Europese Directive 86/609/EEC kent

<sup>236</sup> Commission of the European Communities, Fifth report from the commission to the council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, 2007

geen specifieke bepalingen voor diergebruik in het onderwijs, maar deze zijn in de voorgestelde revisie wel voorzien.

### 7.5.2 Alternatieven

Alternatieven die toegepast worden kunnen grofweg als volgt worden gegroepeerd: computermodellen, niet speciaal voor het onderwijs gedode dieren (ethically sourced animals), video's, slachthuismateriaal, in vitro onderzoek en studies op het eigen lichaam. Met name geavanceerde computerprogramma's worden veel ontwikkeld.

Voordelen van het toepassen van alternatieven zijn dat er over het algemeen minder student-docent interactie hoeft plaats te vinden, dat de kosten lager zijn dan dierproeven, er minder begeleiding noodzakelijk is, deze minder voorbereidingstijd vragen, de toepassing soms niet aan tijd en ruimte gebonden is, etc.<sup>237</sup>. Daarbij draagt de toepassing van proefdiervrije methoden bij aan de attitudevorming van studenten. Nadelen die genoemd worden bij het gebruik van alternatieven zijn o.a. de vaak hoge aanschafkosten, gewenning (aan bijvoorbeeld computers), gebrek aan impact en gemis aan real-life (hands-on) ervaring.

Technische ontwikkelingen maken het mogelijke betere modellen te ontwikkelen voor bijvoorbeeld operatietechnieken, bloedafnametechnieken, etc. Verder lijkt virtual reality in opkomst. Virtual reality is echter duur in ontwikkeling en aanschaf en kan slechts worden gebruikt voor kleine groepen studenten. Deze technieken zullen het proefdier nooit volledig vervangen, hoogstens het gebruik verminderen.

De impact van een model hangt af van de begeleiding van de docent. Er zijn enkele studies uitgevoerd die de leerprestaties bij het gebruik van proefdiervrije modellen hebben afgezet tegen het gebruik van proefdieren. Over het algemeen zijn de resultaten unaniem: de modellen presteren voor wat leerprestaties betreft hetzelfde of soms zelfs beter dan de dierproef<sup>238</sup>. Voor een aantal leerdoelen wordt aangevoerd dat toepassing van alternatieven wel het aantal proefdieren kan verminderen, maar dat dierproeven noodzakelijk zijn en blijven. Dit is met name het geval waarbij dierexperimentele technieken worden aangeleerd, als operatietechnieken, hanteren, dierverzorging, diverse bloedafnametechnieken, etc.

Er zijn diverse mogelijkheden om proefdiervrije modellen te vinden voor het onderwijs. InterNICHE ([www.interniche.org](http://www.interniche.org)) heeft een uitgebreide verzameling modellen beschreven in het boek "From Guinea pig to computer Mouse" en heeft een uitleensysteem voor modellen. NORINA (<http://oslovet.veths.no/NORINA/>) biedt een uitgebreid doorzoekbaar databestand aan. EURCA ([www.eurca.org](http://www.eurca.org)) heeft een beperkt databestand met uitgebreide beschrijvingen en reviews van onderwijsmodellen.

### 7.5.3 Trends met betrekking tot aantallen

Er lijkt nog steeds een toename in het aantal dierproeven in het onderwijs te zijn. Echter, geïnterviewden gaven aan dat door onduidelijke en steeds aangepaste registratiecriteria deze getallen niet als representatief kunnen worden gezien. Toch staat de geregistreerde toename niet op zichzelf. In Duitsland, bijvoorbeeld, is een vergelijkbare toename over de jaren heen te zien. Sommige geïnterviewden geven aan dat men een toename verwacht in het aantal dierproeven dat wordt toegepast

---

<sup>237</sup> van der Valk, et al. 1999, Alternatives to the use of animals in higher education. ECVAM workshop report 33. ATLA 27, 39-52

<sup>238</sup> Knight, A. 2007, Humane teaching methods prove efficacious within veterinary and other biomedical education. AATEX 14, special issue, 213-220

om de vaardigheden op peil te houden van zowel onderzoekers, biotechnici als dierverzorgers (nascholingen). Verder wordt er kritisch gekeken naar de specifieke opleidingen (art 9, 12 en 14) en wordt er verwacht dat er door aan te passen opleidingseisen in de toekomst hiervoor mogelijk meer dierproeven kunnen gaan plaatsvinden. Ook lijken meer proefdieren te worden aangevraagd om nieuwe medewerkers te bekwamen in technieken. Dit is o.a. een gevolg van diverse actoren als: revisie van EU Directive 86/609 en de voorgestelde FELASA accreditatie van proefdierkundig onderwijs, AAALAC accreditatie en GLP. Een tegenkracht zou de toenemende aandacht voor de 3Vs kunnen zijn.

Met betrekking tot cursussen die op FELASA richtlijnen zijn gebaseerd lijkt er een discussie op gang te komen of de trainingen met dieren tijdens de cursus niet toegespitst moeten worden op de diersoorten die de onderzoekers in hun werk (gaan) gebruiken. Het wordt als onethisch gezien om onderzoekers met de gangbare laboratorium dieren te trainen als ze in hun werk bijvoorbeeld alleen met wildlife of met vissen werken. In Noorwegen is dit opgelost door een theoretische cursus aan te bieden gebaseerd op FELASA richtlijnen, aangevuld met een praktische component met de diersoort waarmee de onderzoeker werkt. Voor wat betreft trainingen in specifieke (chirurgische) technieken verwacht men weinig veranderingen. In veel gevallen wordt de eerste fase van de training al op simulatoren aangeleerd. Een gesignaleerde trend lijkt de verschuiving van het diergebruik tijdens verplichte vakken tijdens de bachelorfase naar het gebruik van dieren in vrijwillige vakken tijdens de late bachelorfase en de masterfase. Over het algemeen worden dieren in de bachelorfase alleen nog gebruikt als eerste kennismaking (hanteren, observeren) en voor vakken als vergelijkende anatomie. Dit lijkt echter geen duidelijk effect te hebben op de aantallen dierproeven.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven in onderwijs en training

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
				XXX	XX	XX		

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

## 7.6 Onderzoek naar kanker

### 7.6.1 Introductie

Ruim één op de drie Nederlanders krijgt in de loop van zijn of haar leven kanker<sup>239</sup>. Jaarlijks stijgt de incidentie, onder andere door de vergrijzing van de bevolking. Kanker is een verzamelbegrip en omvat een groot aantal specifieke vormen die in diagnostiek, behandelingsmethoden en overlevingskansen sterk kunnen verschillen. Vormen van kanker met een hoge prevalentie zijn borstkanker, huidkanker, darmkanker en prostaatkanker. In mindere mate longkanker. Ruwweg geneest ongeveer de helft van de kankerpatiënten. Door verbeteringen in de vroege diagnostiek en effectievere behandelingsmethoden is, afhankelijk van de soort kanker, de overlevingstijd toegenomen. Kanker lijkt meer en meer een chronische aandoening te worden. Dit heeft consequenties voor de behandeling die thans vooral bestaat uit chirurgie, chemotherapie, bestraling en immuuntherapie of een combinatie daarvan. Het proces dat tot kanker leidt is nog grotendeels onbegrepen, maar factoren als voeding, milieuverontreiniging en lifestyle kunnen een initiërende rol hebben.

### 7.6.2 Kankeronderzoek en proefdiergebruik.

In 2008 werden in Nederland voor het onderzoek naar kanker bij de mens 52130 dieren gebruikt (Bron Zo doende 2008). Grofweg zijn de volgende gebieden in het kankeronderzoek te onderscheiden waarvoor dierexperimenteel onderzoek wordt uitgevoerd:

- a. Fundamenteel wetenschappelijk onderzoek: vooral gericht is op het ontrafelen van mechanismen achter de tumorigene onttaarding van cellen, en in relatie hiermee de processen die ten grondslag liggen aan tumorgroei, vascularisatie en maligniteit.
- b. Het identificeren van biomarkers voor vroege diagnostiek en voor het bepalen voor de effectiviteit van therapeutische maatregelen
- c. Het ontwikkelen van nieuwe behandelingswijzen of strategieën (chemotherapie, bestraling, hormoon en immunotherapie, chirurgie, andere vormen van behandeling).
- d. Veiligheidsonderzoek: onderzoek naar de potentiële carcinogeniteit van stoffen in het kader van de risicoschatting en normstelling.

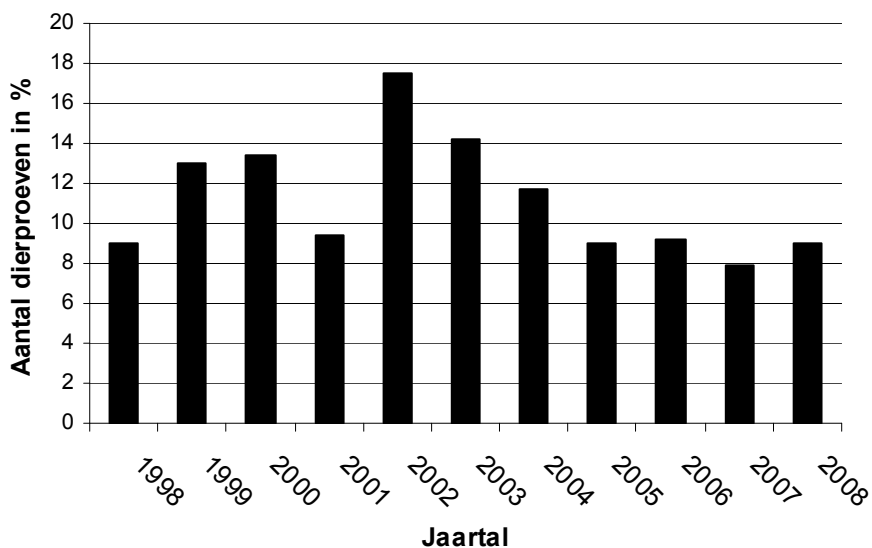
De kengetallen voor het gebruik van proefdieren in het kankeronderzoek staan weergegeven in de grafieken 7.6.1-7.6.4

---

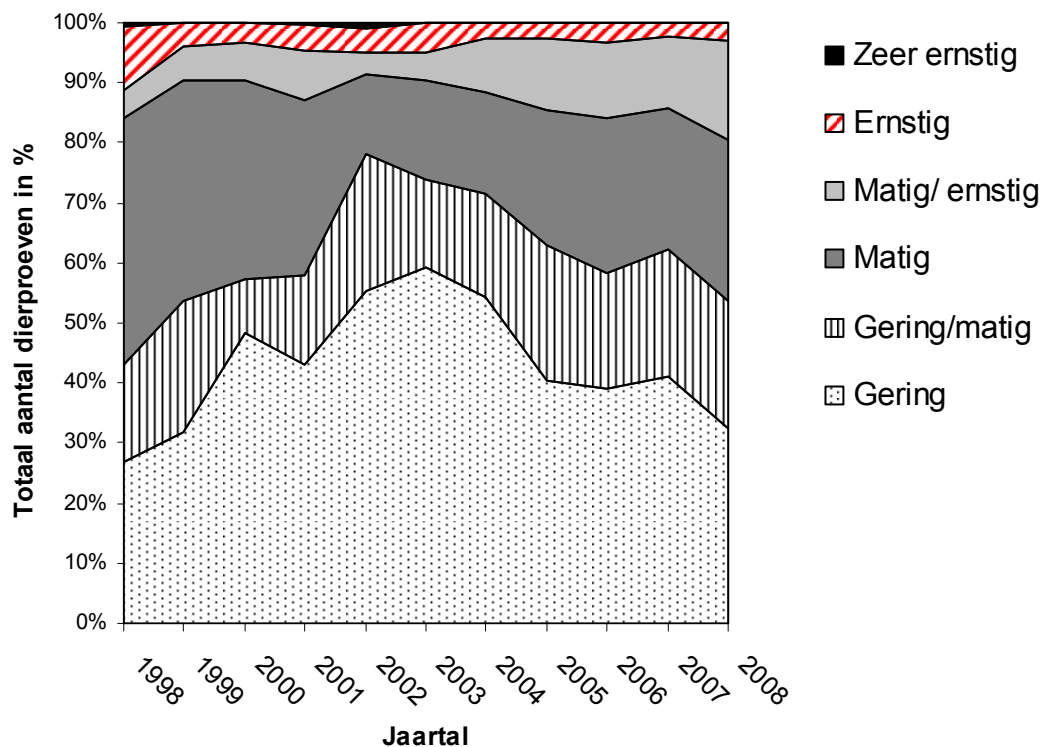
<sup>239</sup> [www.kwfkankerbestrijding.nl](http://www.kwfkankerbestrijding.nl)



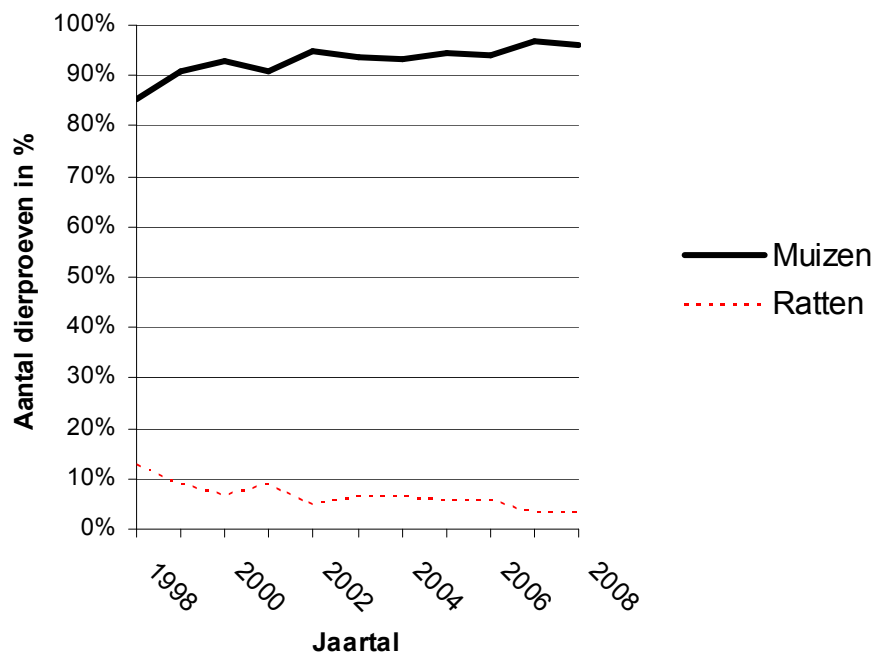
Grafiek 7.6.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van kankeronderzoek in Nederland van 1998-2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).



7.6.2: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van kankeronderzoek (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) in de periode 1998-2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.6.3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van kankeronderzoek (in % van totaal aantal dierproeven bij kankeronderzoek) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.6.4: Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van kankeronderzoek van 1998-2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

### 7.6.3 Dierexperimenteel onderzoek: bestaande modellen

Hoewel het gebruik van *in vitro* modellen voor moleculair en cellulair onderzoek essentieel is en studies in menselijke vrijwilligers voor het klinische werk, kan kankeronderzoek voorlopig nog niet zonder dierproeven.

Omdat zowel de vormen van kanker en de behandelingswijzen zeer divers zijn is het aantal bestaande *in vivo* tumormodellen groot. Een beknopt overzicht wordt gegeven:

- Transplantatie modellen: inbrengen in immuun deficiënte muizen van (humaan) tumorweefsel: op de plaats van het lichaam waar de tumor normaal voorkomt (orthotopisch), of op een andere positie (ectopic) zoals onder de huid of intravenues. Doel is vooral om de werking van chemotherapie of bestraling te onderzoeken;
- Tumor metastase modellen, veelal in knaagdieren. Metastase wordt bestudeerd door in immuun deficiënte dieren tumorcellen intraveneus in te spuiten of metastase spontaan te laten ontstaan uit een solide tumor;
- Muis leukemie modellen. Dit vaak op basis van ascites tumoren voor de evaluatie van chemotherapeutica;
- Cachexie modellen. Transplantatie modellen waarbij de tumorontwikkeling een progressieve cachexie veroorzaakt. Daardoor een bruikbaar model voor tumor gerelateerde stofwisselingsstoornissen en voor tumor vascularisatie;
- Chemisch geïnduceerde tumoren (huid, mammae, colon) voor pathogenese en behandeling van specifieke tumoren;
- Diermodellen met een hoge incidentie spontane tumoren
- Genetisch gemodificeerde dieren of knock-out muizen voor het DNA repair mechanisme. Dieren ontwikkelen veelal op relatief jonge leeftijd een hoge incidentie aan specifieke tumoren. Dieren worden vooral gebruikt voor fundamenteel onderzoek naar de moleculaire en genetische basis van kanker en voor de beoordeling van potentieel carcinogene eigenschappen van stoffen.

### 7.6.4 Trends in het kankeronderzoek

#### *Fundamenteel kankeronderzoek*

Bestuderen van moleculaire, genetische en celmetabolische mechanismen die aan DNA veranderingen ten grondslag liggen en aan de ontregeling van DNA repair mechanismen die in de normale situatie de DNA schade herstellen of de cel tot geprogrammeerde celdood (apoptose) aanzetten. Veel onderzoek gebeurt *in vitro*. Daarnaast worden ook transgene diermodellen gebruikt voor de bestudering van de werking van genen die betrokken zijn bij DNA repair mechanismen. Fundamenteel onderzoek dat gericht is op processen die aan tumorgroei gerelateerd zijn, is deels gebaseerd op *in vitro* modellen en deels op *in vivo* modellen. Processen als vascularisatie zijn moeilijk in een *in vitro* model na te bootsen.

#### *Vroege Biomarkers*

Onderzoek naar biomarkers voor de vroege diagnostiek (zoals PSA voor prostaatumoren) vindt voornamelijk in celculturen plaats. Daarbij spelen moleculair biologische technieken, in het bijzonder het gebruik van transcriptomics en proteomics een steeds belangrijkere rol bij het identificeren van genetische markers, respectievelijk specifieke eiwit markers.

Met betrekking tot proefdiergebruik is de ontwikkeling van nieuwe behandelingsstrategieën van groot belang. Het kan hierbij gaan om modificaties zijn van bestaande technieken als bestraling, maar ook meer innovatief gerichte

methoden, zoals verstoring van het proces van vascularisatie (angiogenese) van groeiende tumoren of het gericht aanbieden aan tumorcellen, onder andere met behulp van monoclonale antistoffen, van chemotherapeutica.

Een sterke toename in het dierexperimenteel kankeronderzoek is te zien in het gebruik van niet invasieve meetmethoden als intravital optical imaging, biophotonic imaging en MRI. Aangenomen wordt dat deze benadering zorgt voor zowel het beschikbaar komen van meer en specifiekere informatie als voor een verlaging van het aantal dieren. Een spin-off van het gebruik van deze methoden kan zijn dat biomarkers worden geïdentificeerd die als vroege eindpunten kunnen worden gebruikt en daarmee het ongerief voor de dieren beperken.

### *Nieuwe chemotherapeutica*

Proefdieren zijn ook nodig voor preklinisch onderzoek van nieuwe chemotherapeutica. Hierbij gaat het om aspecten als veiligheid (bijvoorbeeld de maximaal niet toxische dosis) en de farmaco-kinetiek en dynamiek. Trends zijn hier dat veel vooronderzoek *in vitro* wordt uitgevoerd als pre-screeningsmethoden, waarbij vooral gebruik gemaakt wordt van primaire celculturen van tumoren uit patiënten populaties. Uiteindelijke toetsing voor registratiedossier vindt in diermodellen plaats.

Verwacht wordt dat het veiligheidsonderzoek aan chemotherapeutica, en derhalve ook het gebruik aan proefdieren, in belang zal toenemen. Door vroege diagnostiek en betere behandelingsmethoden komen vormen van kanker steeds meer op de lijst van chronische ziekten te staan. De consequentie zal zijn dat patiënten langdurig medicijnen zullen moeten gebruiken waardoor er andere veiligheidseisen eisen aan de geneesmiddelen gesteld zullen worden. Uitgebreide veiligheidstesten zijn ook noodzakelijk voor de behandeling met monoclonale antistoffen. Zaken als tolerantie en sensibilisatie zijn hierbij belangrijk. Met betrekking tot immunotherapeutica wordt verwacht dat de cellulaire immuuntherapie aan belang zal toenemen. Door geïnterviewde deskundigen wordt het gebruik van pluripotente stamcellen voor regeneratiedoeleinden als prematuur beschouwd.

### *Ongerief en humane eindpunten*

Kankeronderzoek kan met ernstig ongerief gepaard gaan, bijvoorbeeld in studies naar de maligniteit van tumoren of de effectiviteit van chemotherapeutica. Welzijnsbewaking van proefdieren en het terugbrengen van het ongerief zijn dan ook belangrijke onderwerpen in het kankeronderzoek. In 1999 is door de Nederlandse overheid de Code of Practice Kankeronderzoek in Nederland gepubliceerd<sup>240</sup> en door de UK Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) is het document 'Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia' (1998) uitgebracht<sup>241</sup>. Een belangrijk aandachtspunt in beide rapporten is het toepassen van humane eindpunten. De geïnterviewde deskundigen geven aan dat identificatie van nieuwe, vroege eindpunten onder andere door technologieën als niet invasieve meetmethoden en omics een belangrijk bijdrage zal kunnen leveren aan het terugdringen van het ongerief.

### *Keuze diermodel*

Het gebruik van ratten voor kankeronderzoek is beperkt en blijft vrij stabiel. Daarentegen stijgt het gebruik van de muis. Dit komt vooral door de introductie van

---

<sup>240</sup> Inspectie W&V, Code of practice dierproeven in het kankeronderzoek, Den Haag 1999

<sup>241</sup> UKCCCR.(1989). UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. Cancer and Metastasis Reviews. 8: 82-88.

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik

---

genetisch gemodificeerde dieren. Daarnaast vindt een verschuiving plaats naar onderzoek met zebravissen. Konijnen en landbouwhuisdieren worden zelden gebruikt.

### Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven in kankeronderzoek

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
		XX				X	XXX	XXX

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

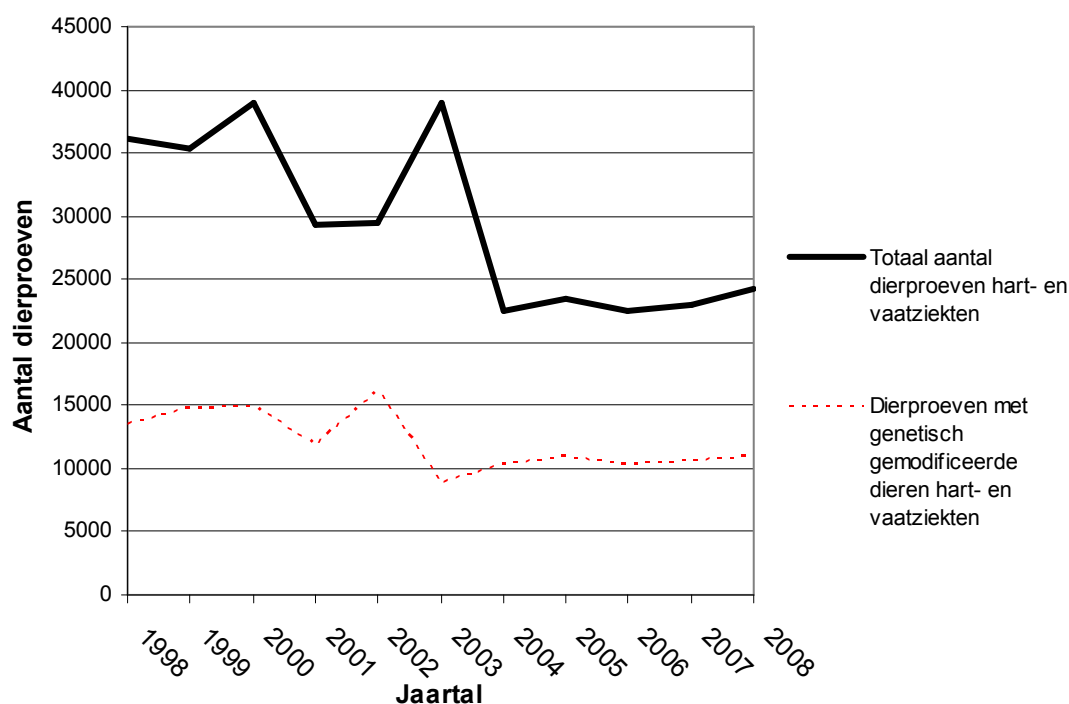
## 7.7 Trendanalyse hart- en vaatziekten

### 7.7.1 Introductie

Hart- en vaatziekte is de belangrijkste doodsoorzaak van de westerse wereld. Met uitzondering van het jaar 2008 is het doodsoorzaak nummer 1 in Nederland. In 2008 overleden er 21360 mensen aan hart en vaatziekten waarvan 4906 aan coronaire hartziekten, 5597 aan hersenvatletsel, en 7024 aan overige hart-en vaatziekte. Sterfte aan hart en vaatziekten neemt echter de laatste 20 jaar wel af. Dit komt met name doordat de behandelmethodes bij hartinfarcten en hartfalen sterk zijn verbeterd (statline.CBS.nl).<sup>242</sup> Dit neemt niet weg dat het aantal mensen wat lijdt aan hart en vaatziekten naar verwachting zal stijgen als gevolg van veroudering van de bevolking (Volksgezondheid Toekomstverkenning, 2006). Hart en vaatziekten kennen zowel een genetische oorzaak als factoren die te maken hebben met leefstijl.<sup>243</sup> (Volksgezondheid Toekomst Verkenning, 2006)

### 7.7.2 Onderzoek naar hart- en vaatziekten en proefdiergebruik

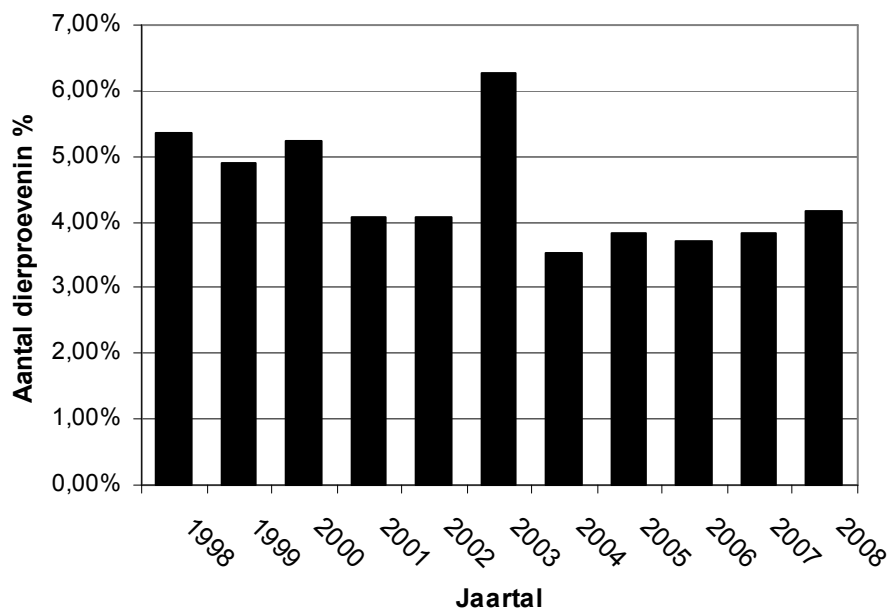
De laatste jaren lijkt het aantal dierproeven dat uitgevoerd is voor beantwoording van een wetenschappelijke vraag met betrekking tot hart- en vaatziekten te zijn afgenomen te zijn in 2004 waarna het redelijk gestabiliseerd lijkt te zijn (grafiek 7.7.1 en 7.7.2)



Grafiek 7.7.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar hart- en vaatziekten 1998-2008. Daarnaast worden het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren aangegeven binnen deze doelstelling (Bron: Zo doende 1998-2008).

<sup>242</sup> CBS, Doodsoorzaak; korte lijst (belangrijke doodsoorzaken), leeftijd, geslacht; Statline.cbs.nl/statline, 28 mei 2009

<sup>243</sup> Volksgezondheid Toekomst Verkenning, Nationaal Kompas Volksgezondheid. Bilthoven: RIVM 2006



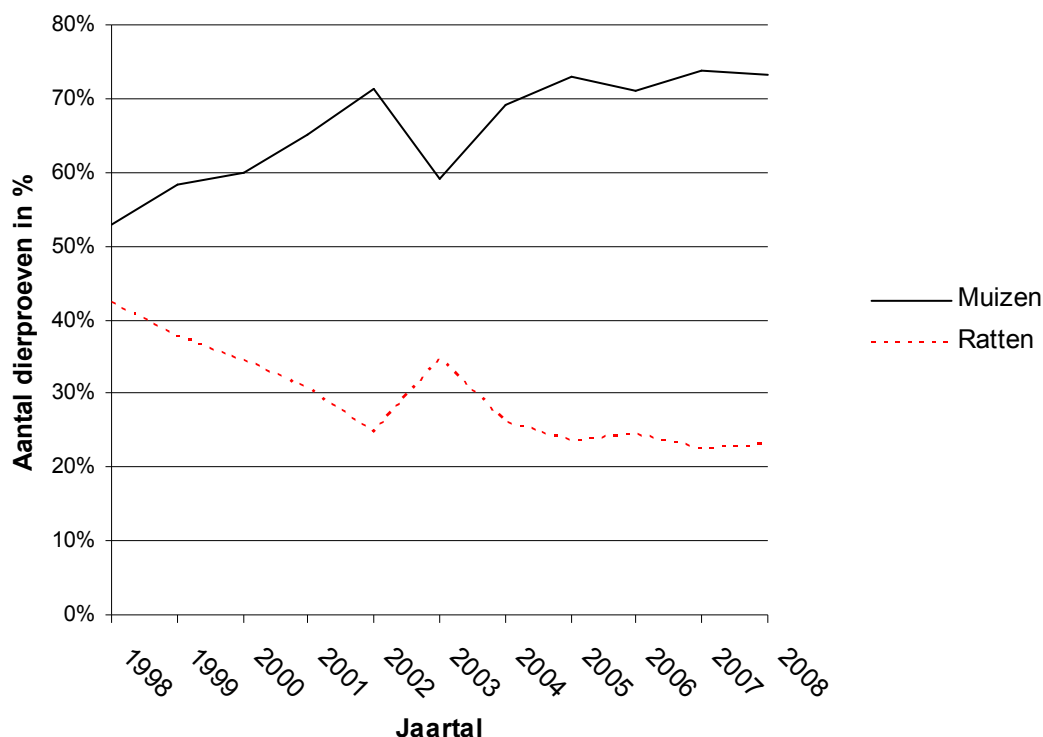
Grafiek 7.7.2: Aantal dierproeven uitgevoerd ten behoeve van het onderzoek naar hart-en vaatziekten, (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) in de periode van 1998- tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

Het ongerief wat de dieren ondervinden bij dit type onderzoek lijkt echter niet afgenomen (zie grafiek 7.7.3). Er lijken zelfs meer dieren matig tot ernstig ongerief te ondervinden.



Grafiek 7.7.3: Mate van ongerief bij dierproeven (in % van het totaal voor dit doel) uitgevoerd in het kader van onderzoek naar hart- en vaatziekten in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Er worden voornamelijk muizen en ratten gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek naar hart –en vaatziekten (zie grafiek 7.7.4). In geringere aantallen worden er grote landbouwhuisdieren gebruikt en honden. Opvallend tot slot is het gebruik van een klein aantal amfibieën (bron: Zo doende 1998 tot 2008).



Grafiek 7.7.4: Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar hart en vaatziekten van 1998-2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

De meeste dierproeven die worden uitgevoerd om een wetenschappelijke vraag te beantwoorden met betrekking tot hart- en vaatziekten worden uitgevoerd bij wetenschappelijke instellingen (tussen de 85en 95% tussen 1998-2007 (Zo doende 2003 en 2007)).

### 7.7.3 Dierexperimenteel onderzoek

Het dierexperimenteel onderzoek naar hart en vaatziekten omvat een breed scala aan ziekten en modellen. Daarbij is onderscheidt te maken tussen conceptuele modellen (waarbij men zoekt naar mechanismen die hart- en vaatziekten veroorzaken); fysiologische modellen, klassieker fenotypische modellen van bijvoorbeeld hartfalen door fysiologisch ingrijpen of transgene dieren) en therapeutisch modellen die men gebruikt voor het uittesten van medicijnen of andere behandelingsmethoden.

Om inzicht te geven in de diermodellen die gebruikt worden voor onderzoek aan hart en vaatziekten zijn hieronder een aantal beschreven:

- Artherosclerose modellen: veelal knock out muizen.
- Infarct modellen: dit zijn modellen waarbij een hartinfarct wordt opgewekt door, via een chirurgische ingreep, een ader te beknellen.
- Modellen voor hartfalen door thoracic aorta constriction (TAC), angeotensine en pacing. Bij TAC wordt er een band om de aorta gelegd waardoor er een

verhoogde bloeddruk wordt opgewekt in het hart. Dit leidt tot een verdikte hartspier en na een paar maanden tot hartfalen. Angeotensine zorgt voor een vernauwing van de bloedvaten die uiteindelijk leiden tot hartfalen. Tot slot kan men hartfalen opwekken door verstoring van het hartritme, pacing. Pacing gebeurt vooral in grote proefdieren als honden en varken.

- Hypertensie modellen: modellen die hoge bloeddruk modelleren.
- Ischemic hind limb model om ziekten aan de arteriën te modelleren. Dit model maakt men door een arterie in de achterpoot van een muis af te sluiten.

### 7.7.4 Trends

*Meer mechanistisch onderzoek met proefdieren maar afname belang proefdier in late preklinisch onderzoek*

Het belang van het proefdier als model in het mechanistische onderzoek neemt toe. Echter in het late pre- klinische onderzoek neemt de rol van het proefdier af. De reden hiervoor is dat men in een eerder stadium behandelingen test in mensen dan vroeger het geval was. Voorheen waren zowel effectiviteitsstudies als veiligheidsstudies in dieren van belang. Omdat men steeds meer tot het inzicht komt dat in diermodellen moeilijk de effectiviteit van een behandeling in de mens kan worden voorspeld, test men eerder de effectiviteit in mensen. Alleen de veiligheid wordt getest in dieren.

*Gebruik van kleinere proefdieren: transgene muizen en zebrafissen*

Daarnaast zijn verschuivingen met betrekking tot de gebruikte diersoorten waar te nemen. Allereerst wordt steeds vaker gebruik gemaakt van transgene muizen. Muizen zijn klein en men kan ten opzichte van andere dieren bij muizen gemakkelijker genen aan en uit zetten of anderszins modificeren. Ten tweede kan het gebruik van zebrafissen gezien worden als een belangrijke trend. Net als bij de muis is van de zebrafis het hele genoom bekend en zijn genen relatief eenvoudig aan en uit te zetten. Verder zijn zebrafissen de eerste drie dagen van hun leven doorzichtig. Hierdoor vormen de visjes goede modellen voor de bestudering van embryologische ontwikkeling. De belangstelling voor kleine dieren heeft zowel een wetenschappelijk als een praktische reden. Praktisch gezien kunnen kleine dieren makkelijker gehuisvest worden en wordt het hierdoor mogelijk gemaakt om grotere proefgroepen te vormen. Er wordt momenteel alleen gebruik gemaakt van grotere dieren bij de eindfase van pre- klinisch onderzoek, bijvoorbeeld voor het testen van implantatie materiaal. Materialen, zoals pacemakers en arteriële transplantaten die voor de mens gebruikt worden, kunnen niet getest worden in een muis of rat omdat deze te groot zijn voor knaagdieren. Per type onderzoek maakt men gebruik van verschillende dieren. Arteriële transplantaten worden getest in varkens, elektrofysiologisch onderzoek wordt gedaan in geiten en hartkleppen worden getest in schapen. Honden worden haast niet meer gebruikt binnen cardiovasculair onderzoek. Fysiologische modellen waarbij modellen worden gemaakt door bijvoorbeeld arteriën af te sluiten worden door genomics technieken en knock out muizen minder belangrijk

*Toename chronische modellen*

Mogelijk kunnen chronische modellen voor hart-en vaatziekten die door transgene muizen gecreëerd worden leiden tot meer ongerief omdat de experimenten langer duren. Bij langere experimenten worden vaker metingen verricht aan het dier waar door het ongerief mogelijk stijgt. Een andere oorzaak voor een verminderd ongerief is de toename van beenmergtransplantaties ten behoeve van het onderzoek naar hart-en vaatziekten (bijvoorbeeld voor het oogsten van stamcellen).

### *Cellijnen*

Een andere trend die genoemd worden in verband met hart-en vaatziekten zijn de ontwikkeling van cellijnen, hybridoma's, die grote hoeveelheden antilichamen kunnen produceren. Deze antilichamen kunnen bijvoorbeeld gebruikt worden voor het signaleren van indicatoren voor een hart infarct.<sup>244</sup> Cellijnen zijn daarnaast binnen het fundamentele onderzoek naar hart-en vaatziekten van belang. Hiermee wordt bijvoorbeeld onderzocht hoe de signalering door de celwand werkt. Ook micro-organismen worden hiervoor de laatste jaren gebruikt.

### *Tissue engineering*

Met tissue engineering kunnen bijvoorbeeld bloedvaten of andere stukken weefsels gemodelleerd worden door middel van geometrische structuren van biomaterialen.<sup>245</sup> Een andere trend is het maken van embryoachtige structuren met behulp van stamcellen om in een systeem te kunnen testen en om processen te achterhalen van de embryologische ontwikkeling van hart en bloedvatstelsel<sup>246</sup>.

Als kanttekening wordt wel gemaakt dat de impact van in vitro systemen op het proefdiergebruik vooralsnog niet zo groot is. Hiervoor worden biologische mechanismen nu nog te slecht begrepen. Daarnaast heeft men onderzoek in proefdieren nodig om goed te begrijpen hoe *in vivo* processen werken en deze *ex vivo* te kunnen nabootsen. Er moet meer bekend zijn van de biologische processen voordat een model bloedvat gebruikt kan worden voor interventie. En het ontwikkelen van dit soort technieken moet populairder worden bij wetenschappers.

### *Genomics*

Hoewel genomics ook wordt genoemd in verband met een te verwachte stijging van het aantal dierproeven door de opkomst van de transgene muis, wordt toxicogenomics genoemd als een belangrijke trend die tot vermindering en vervanging kan leiden. Toxicogenomics zou met name van belang zijn binnen high through put tests die geneesmiddelen testen op veiligheid.. Ook in het fundamentele onderzoek is genomics van belang. Genomicstechnieken worden bijvoorbeeld gebruikt bij onderzoek naar intracellulaire eiwitten en andere biomarkers

### *Ontwikkelingen anesthesie*

De respondenten verwachten dat nieuwe kennis over anesthesie voor verfijning zal zorgen.

### *Telemetriesensoren*

Telemetrie sensoren geven meer informatie uit de bewuste toestand waardoor het aantal benodigde proefdieren enorm verkleind wordt. Daarbij is het moeilijk om te zeggen of het ongerief daadwerkelijk afneemt want de sensoren zijn vaak nog groot. Dit komt voornamelijk doordat de batterijen in de sensoren groot zijn. Muizen nemen soms 15% toe in gewicht door de implantatie van een sensor.

### *Imaging*

---

<sup>244</sup> Katus H.A., Looser S., Hallermayer K., Remppis A., Scheffold T., Borgya A., Essig U., Geuss U., Development and In Vitro Characterization of a New Immunoassay of Cardiac Troponin T, *Clinical Chemistry*, 1992, 38(3): 386-393

<sup>245</sup> Hutchmacher D.W., Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterial Science* 2001, 12(1): 107-124

<sup>246</sup> Ramaswamy, S., Gottlieb, D., Engelmayer Jr G.C., Aikawa E., Schmidt D.E., Gaitan-Leon D.M., Sales Y.L., Mayer Jr J.E., Sacks M.S., The role of organ level condition on the promotion of engineered heart valve tissue development in-vitro using mesenchymal stem cells, 2010, 31(6):1114-1125

In vivo imaging: MRI scan, CT scans, moleculaire expressie methoden met een tracer die moleculaire expressie herkent, whole body imaging zijn andere belangrijke trends die genoemd zijn in verband met verfijning. Imaging technieken bij mensen hebben geen effect op het dierproefgebruik in het onderzoek naar hart-en vaatziekten volgens de respondenten

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Hart- en vaatziekten

	Ongewer- velden	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	in silico	Slachthuis materiaal	Menselijke vrijwilligers	Genomics	Weefsel- kweek
					X		XX	XXX

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

## 7.8 Trendanalyse Geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel

### 7.8.1 Introductie

In Zo doende zijn de geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel in één categorie geplaatst. Bij geestesziekten gaat het vooral om ziekten met een sterke mentale component en het op het oog ontbreken van een pathofysiologische component. Bij ziekten van het zenuwstelsel staat de pathofysiologie voorop en liggen de klinische verschijnselen vooral op het fysieke vlak. Tot de geestesziekten behoren o.a. schizofrenie, borderline syndroom, autisme e.a.. Onder de ziekten van het zenuwstelsel vallen onder andere MS en de ziekte van Parkinson. In Zo doende worden aantallen dierproeven niet gedifferentieerd naar de subcategorieën geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel.

Uitgaande van deze indeling lijkt de incidentie van geestesziekten niet toe of af te nemen, wel staat de categorie op de 2<sup>e</sup> plaats in de categorie ziekten die het prestatievermogen van mensen aantast<sup>247</sup>. Bij ziekten van het zenuwstelsel is er wel een toename te constateren, dit door de vergrijzing van de bevolking.

De grens tussen geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel vervaagt doordat bij geestesziekten steeds beter een relatie te leggen is tussen fysiologische en cellulaire veranderingen in de hersenen en afwijkend gedrag zoals ook duidelijk aanwezig bij ziekten van het zenuwstelsel. Het gebruik van imaging technieken heeft hieraan mede bijgedragen. Verder is duidelijk geworden dat ook bij ziekten van het zenuwstelsel allerlei emotionele en cognitieve veranderingen optreden

Voor de categorie geestesziekten vindt verder een revisie van het bestaande classificatiesysteem plaats. Tot op heden was de classificatie gebaseerd op uniciteit van elke ziekte en bestond een strikt onderscheid tussen bijvoorbeeld schizofrenie en fobieën. Behandelingstrategieën waren gerelateerd is aan de ziekte. Nieuw uitgangspunt is de constatering dat veel geestesziekten heterogeen zijn voor wat betreft het ziektebeeld en onderliggende pathofysiologie. Tussen veel vormen van geestesziekten bestaat een mate van overlap in pathofysiologie. Consequentie hiervan is dat er een andere farmacologische behandeling-strategie nodig is: meer personal based en gericht op componenten van het afwijkend gedrag. Dit heeft indirect invloed op het dierexperimenteel onderzoek omdat het onderzoek een

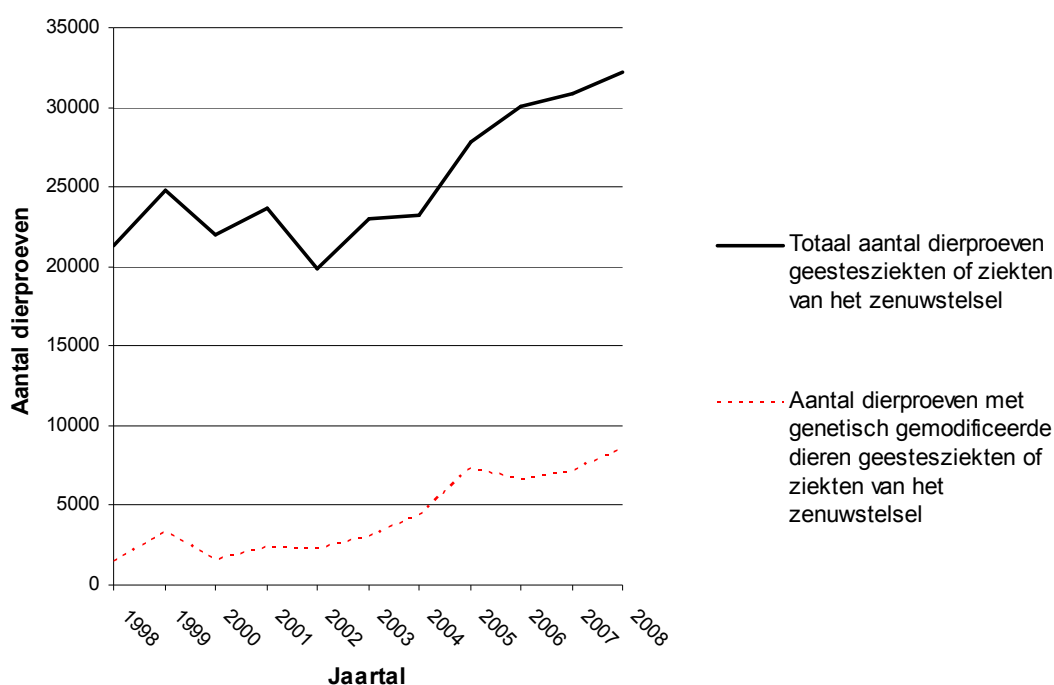
---

<sup>247</sup> <http://www.mentalhealth.com/>

andere focus heeft gekregen. Onderzoek m.b.t. geestesziekten heeft momenteel een duidelijke focus op een differentiatie van de subklassen, endophenotypering op basis van gedragsonderzoek en bijbehorende neurale veranderingen. Men probeert hiervoor specifieke componenten van heterogene ziektebeelden te bestuderen. Hierbij spelen nieuwe ontwikkelingen in de imaging technieken als PET, fMRI een belangrijke rol.

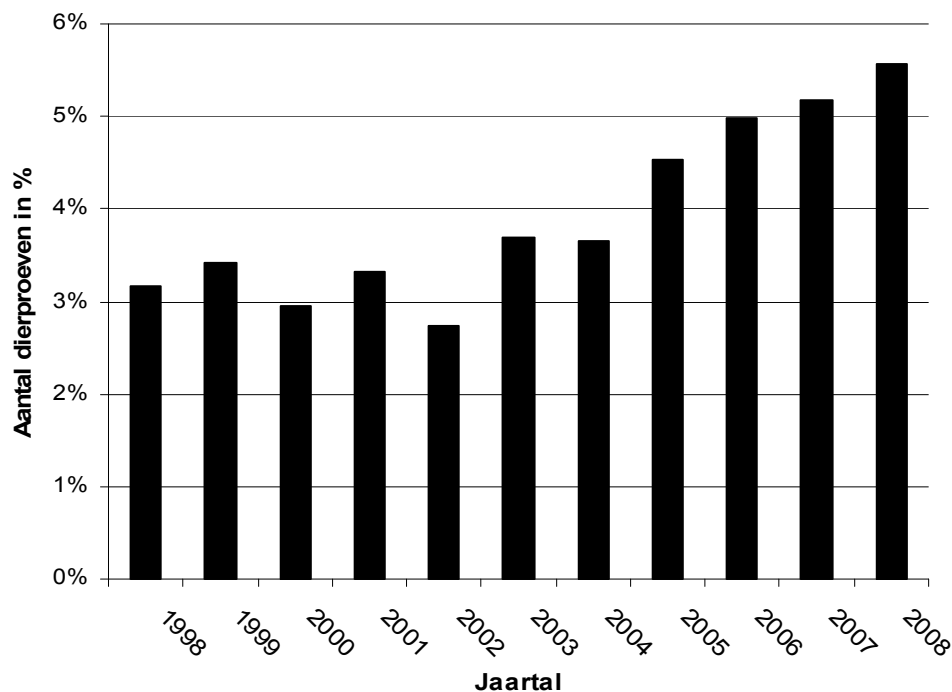
### 7.8.2 Proefdiergebruik

Informatie over het proefdiergebruik in Nederland in de periode 1998 – 2008 voor de categorie geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel wordt gegeven in de onderstaande grafieken. Hieruit valt een stijging in het gebruik van dieren op te maken, voor een belangrijk deel te verklaren uit een stijging in het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren. Voor wat de meest gebruikte diersoorten betreft valt een stijging op in het gebruik van muizen en, na een periode van daling, in het gebruik van ratten. Over de tijd laat de verdeling van ongerief weinig schommelingen zien.

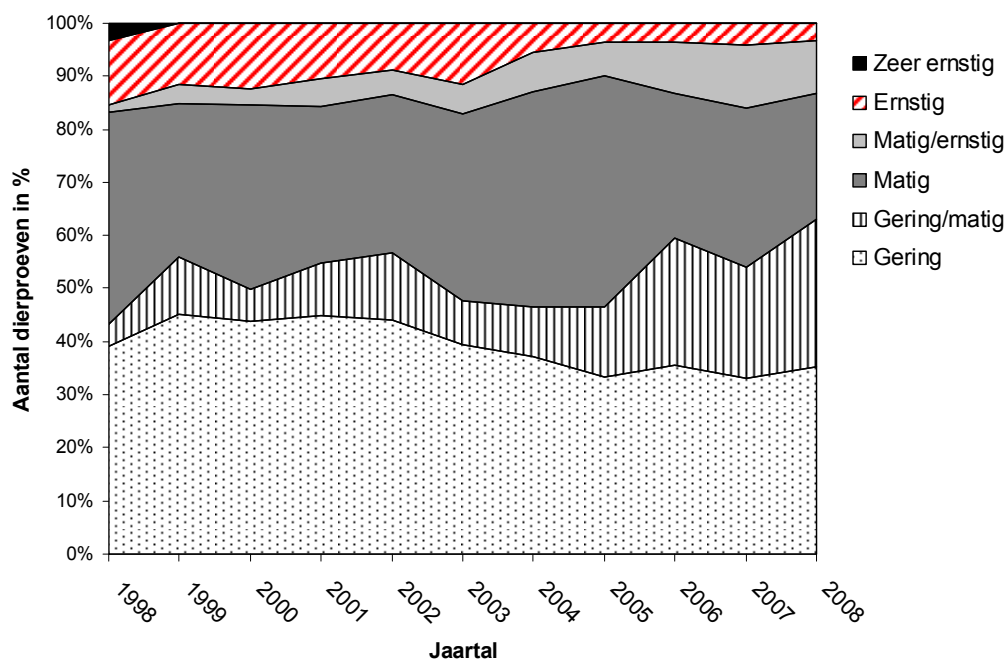


7.8.1 Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar geestesziekten of ziekten aan het zenuwstelsel in Nederland van 1998-2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven bij deze doelstelling met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



7.8.2 Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar geestesziekten of ziekten aan het zenuwstelsel (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) van 1998-2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).



7.8.3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar geestesziekten of ziekten aan het zenuwstelsel (in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



7.8.4 Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar geestesziekten of ziekten aan het zenuwstelsel (in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Binnen het onderzoek naar geestesziekten worden proefdieren vooral gebruikt voor onderzoek naar fundamenteel neurofysiologisch/neurpathologisch processen, bestudering van geïnduceerde gedragsveranderingen, ontwikkeling van specifieke farmaca en het pre-klinisch onderzoek (safety testing). Veel onderzoek is gebaseerd op gedragsmodellen, in de farmaceutische industrie zijn deze vaak gestandaardiseerd om een zekere high-throughput mogelijk te maken.

Voor wat de diermodellen betreft wordt staan de begrippen face-validity, construct validity en predictive validity centraal. Face-validity is de keuze voor een diermodel die overeenkomsten vertoont in fenomenologie met de mens, bij construct-validity staan overeenkomsten in etiologie en pathofysiologie centraal. De keuze wordt ingegeven door de vraagstelling. Zo is bij veel verslavingsonderzoek face-validity het uitgangspunt

De ontwikkelingen in het dierexperimenteel onderzoek zijn in belangrijke mate gericht op aanbrengen van een verfijning in de zin dat specifieke componenten van (heteroge) ziektebeelden kunnen worden bestudeerd. Uitgangspunt zijn de kerneigenschappen van de ziekte, bijvoorbeeld de verstoring van informatieverwerking bij schizofrenie. Belangrijk hierin is de versterkte interactie met de kliniek (translationeel) waarbij kennis over ziektebeelden wordt gedeeld en waarbij humane data worden gebruikt voor sturing in de dierexperimentele vraagstelling.

Men gebruikt met name de muis en rat (50/50) in het onderzoek naar geestesziekten. De rat heeft voordelen voor wat betreft het uitvoeren van complexe opdrachten en de hanteerbaarheid. Voor de muis wordt vooral gekozen bij studies naar de genetische basis. Transgene muizen worden vooral gebruikt in studies naar de functionaliteit van genen. Transgene rattenstammen zijn tot op het heden weinig succesvol gebleken. Een enkele keer worden niet humane primaten gebruikt voor bestudering van

cognitieve processen. Het ongerief wordt in het algemeen als matig ingeschat en hangt af van het te onderzoeken ziektebeeld.

Het diermodel zal belangrijk blijven in het onderzoek naar geestesziekten omdat er vervangingsmogelijkheden zeer beperkt zijn. Veel van de pathologische fenomenen zijn gerelateerd aan een interactie van pathofysiologische veranderingen met gedragsmatige aspecten die in een compleet organisme bekeken moeten worden.

#### *Ziekten van het zenuwstelsel*

Onder ziekten van het zenuwstelsel vallen aandoeningen van de hersenen, ruggemerg en de zenuwen. Belangrijke ziekten die hieronder vallen zijn chronische (degeneratieve) aandoeningen zoals de ziekte van Parkinson, Multiple Sclerose en epilepsie.

Aan de ziekte van Parkinson lijden circa 25.000 mensen in Nederland en de verwachting is dat dit aantal tot 2025 met bijna 50% zal stijgen. Over de oorzaak van de ziekte is nog weinig bekend. Mogelijk berust het op een interactie van niet-genetische factoren met genen die de gevoeligheid voor de ziekte bepalen. Multiple Sclerose (MS) komt voor bij circa 14.000 Nederlanders en ook deze aandoening neemt procentueel toe. Evenals bij de ziekte van Parkinson is nog veel onbekend over de aetiologie.

Epilepsie is in veel gevallen een aandoening die in combinatie met andere aandoeningen voorkomt of kan het resultaat zijn van een beroerte. Aan epilepsie lijden circa 64.000 mensen in ons land. De verwachting is dat dit aantal gelijk blijft<sup>248</sup>. Voor bestudering van deze ziekten wordt een scala aan diermodellen gebruikt, vooral in knaagdieren maar ook in primaten. Een bekend voorbeeld is het EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) model in knaagdieren waarbij door inspuiting van hersenweefsel of myeline met adjuvant zich een inflammatoire demyelinisatie ontwikkelt leidend tot een ziektebeeld dat gelijkenis vertoont met MS. Diermodellen worden vooral gebruikt om aspecten als pathofysiologie, neurofysiologie, de genetische component van de ziektes of de mogelijkheden van farmacotherapie te bestuderen. In de komende jaren zal veel aandacht uitgaan naar de mogelijkheden in het gebruik van stamcellen. Over het algemeen is het dierexperimenteel onderzoek belastend voor de dieren, dit door de aangebrachte laesies en door het chronische verloop.

#### *Alternatieven voor dierproeven ziekten van te zenuwstelsel*

De mogelijkheden van 3V alternatieven zijn beperkt. Gezien de kenmerken van de gangbare diermodellen is het gebruik van humane eindpunten een belangrijk aandachtsggebied om het ongerief voor de dieren te beperken. Voor deelvraagstellingen van het onderzoek kan en wordt gewerkt met celculturen, onder andere om veranderingen op celniveau te bestuderen. In het verlengde hiervan ligt het gebruik van patiëntenmateriaal in de vorm van de hersenbanken die op verschillende plaatsen in de wereld bestaan.

Niet op het terrein van vervanging maar wel in relatie tot vermindering biedt het gebruik van GM modellen, in de context van een toename van de relevantie van het onderzoek. Tenslotte wordt voor de ziekte van Parkinson ook onderzoek verricht inde

---

<sup>248</sup> [http://www.rivm.nl/vtv/object\\_class/kom\\_parkinson.html](http://www.rivm.nl/vtv/object_class/kom_parkinson.html)

zebravis<sup>249</sup>, dit op grond van het gegeven dat er een overeenkomst bestaat tussen mens en zebravis voor relevante genen.

### 7.8.3. Trends in de categorie Geestesziekten en ziekten zenuwstelsel

De verwachting is dat het diermodel belangrijk zal blijven in het onderzoek naar geestesziekten omdat vervangingsmogelijkheden zeer beperkt zijn. Veel van de pathologische fenomenen zijn gerelateerd aan een interactie van pathofysiologische veranderingen met gedragsmatige aspecten die in een compleet organisme bekeken moeten worden. Wel zal in toenemende mate gebruik gemaakt worden van beeldvormende technieken.

Mogelijke andere trends zijn:

- Computermodellen (neurale netwerken): alleen bruikbaar voor bestudering van specifieke onderdelen van de subvraagstellingen. Verder geldt dat teruggegaan moet worden naar het diermodel om de resultaten te valideren.
- Databanken (o.a. epidemiologie): deze zijn vooral hypothese initiërend en leiden tot aanvullend dierexperimenteel onderzoek.
- Weefselkweek: vooral ex vivo onderzoek voor screening potentiële farmaca. Primaire neuronale kweken worden vooral in het fundamenteel onderzoek gebruikt.
- Humaan onderzoek: vooral genetisch. Ook hiervoor geldt dat het onderzoek hypothese initiërend en synergistisch is.
- Voordeel van het diermodel is de induceerbaarheid: uitschakeling van bepaalde celclusters of veranderingen op receptorniveau.
- Aan belang wint het –omics onderzoek. Draagt bij aan de identificatie van causale genenclusters en bijdrage van genmutaties aan het uiteindelijke fenotype.

Voor ziekten van het zenuwstelsel geldt dat de incidentie van deze aandoeningen zal toenemen. In dat opzicht is het ook gerelateerd aan de vergrijzing van de bevolking. Zeker gezien tegen de achtergrond van de beperkte kennis van deze ziekten is de verwachting dat het onderzoek daarnaar de komende jaren zal toenemen. Gezien de complexiteit van het ziektebeeld ligt het niet in de lijn van de verwachting dat dit zonder dierproeven kan. Onderzoek naar verfijningsmaatregelen als het gebruik van humane eindpunten zal daardoor in de belangstelling blijven staan. Daarnaast zal het gebruik van celculturen en patiëntenmateriaal onderzoek naar deelaspecten mogelijk maken. Verder zullen GM diermodellen belangrijk blijven en zal mogelijk onderzoek n lagere diersoorten als de zebravis mogelijk zijn.

#### Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven geestesziekten en ziekten van het zenuwstelsel

	Weefselkweek	Immunochemisch	Fysischchemisch	Ongewervelden	Mol.biol methoden	Slachthuis	Mathematische modellen	Menselijke vrijwilligers
geestesziekten	X				XX			X
Ziekten CZS	XX				X			XX (orgaandonatie)

De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing

<sup>249</sup> Phillips W, Michell A, Pruess H and Barker RA. (2009). Animal models for neurodegenerative diseases. Methods Mol.Biol. 549: 137-155.

## 7.9 Andere ziekten bij de mens

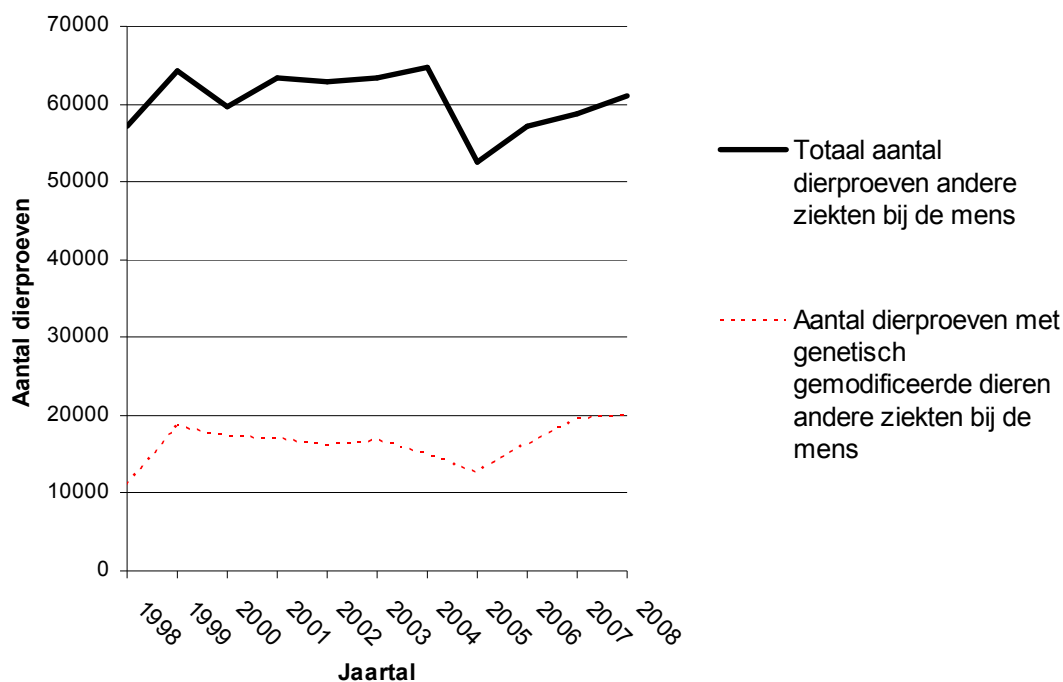
### 7.9.1 Introductie

Een onderzoeksdoel waarvoor volgens de gegevens uit Zo doende aanzienlijke aantallen proefdieren worden gebruikt is de categorie 'Andere ziekten bij de mens'. Op grond van de beschikbare gegevens valt voor dit onderzoeksdoel geen verdere specificatie te geven naar subdoelen. Aangenomen wordt dat aandoeningen als auto-immuunziekten, diabetes, infectieziekten, nierziekten, stofwisselingsziekten en longziekten belangrijke aandachtsgebieden zijn. Veel van de ziekten worden ook wel aangeduid als behorend tot de categorie 'life-style' ziekten (zie ook 4.2.3.). Omdat het te ver gaat elk specifiek onderzoeksdoel uitvoerig te beschrijven met betrekking tot de aspecten diermodellen en 3V alternatieven zal de behandeling van de subdoelen worden beperkt tot suikerziekte en infectieziekten en longziekten. De belangstelling voor beide ziekte categorieën is de laatste jaren sterk toegenomen, mede door veranderingen in onze life style. Zo is suikerziekte, in het bijzonder Type 2, gerelateerd aan veranderde voedingsgewoonten en draagt de globalisering bij aan de verspreiding van infectieziekten. Onderzoek naar deze doelen wordt dan ook gestimuleerd en impliciet hieraan is het gebruik van proefdieren.

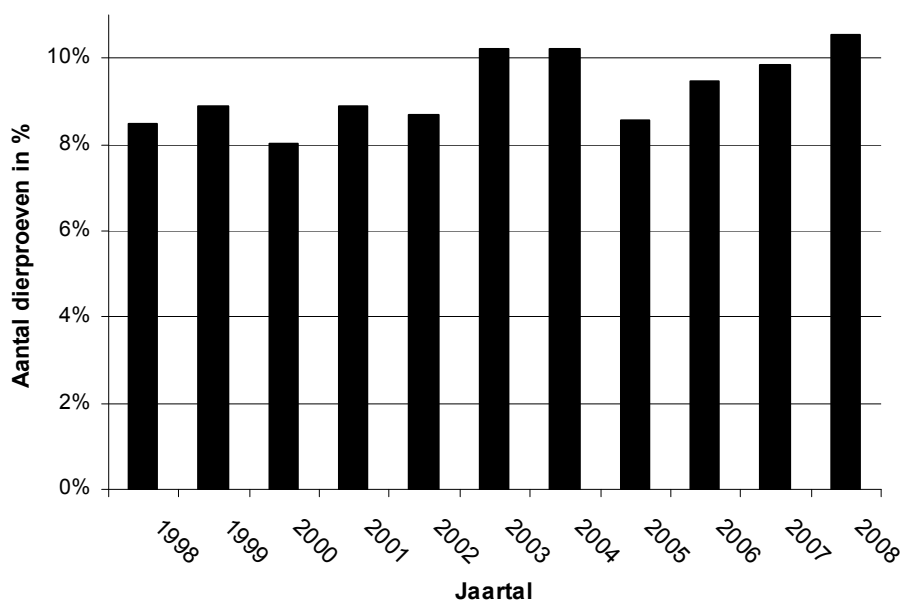
### 7.9.2 Andere ziekten bij de mens en proefdiergebruik

In 2007 werden in Nederland 58.845 dierexperimenten uitgevoerd ten behoeve van de categorie 'Andere ziekten bij de mens'. Omdat, zoals genoemd, de subdoelen van onderzoek divers zijn, kan niet in algemene zin worden aangegeven om welke type diermodellen het gaat. Aangenomen mag echter worden dat aspecten als etiologie, ziekteverloop en ziekte-interventie belangrijke aandachtsgebieden in het onderzoek zijn en de gebruikte diermodellen hierop zijn toegespitst. .

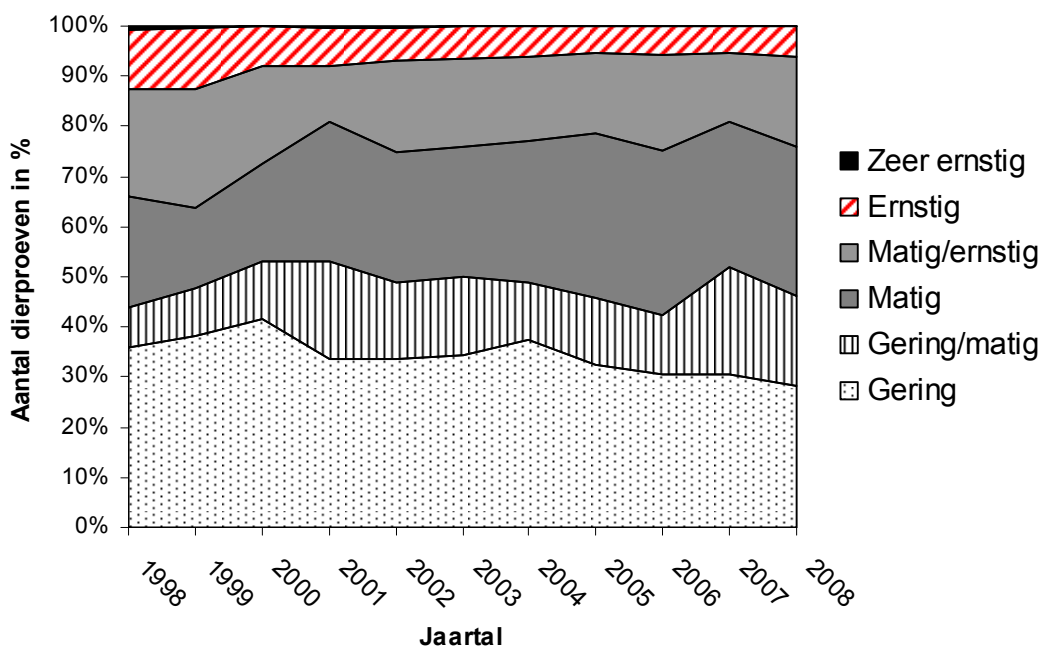
De kengetallen voor het gebruik van proefdieren voor de categorie 'Andere ziekten bij de mens' staan weergegeven in de grafieken 7.9.1-7.9.4.



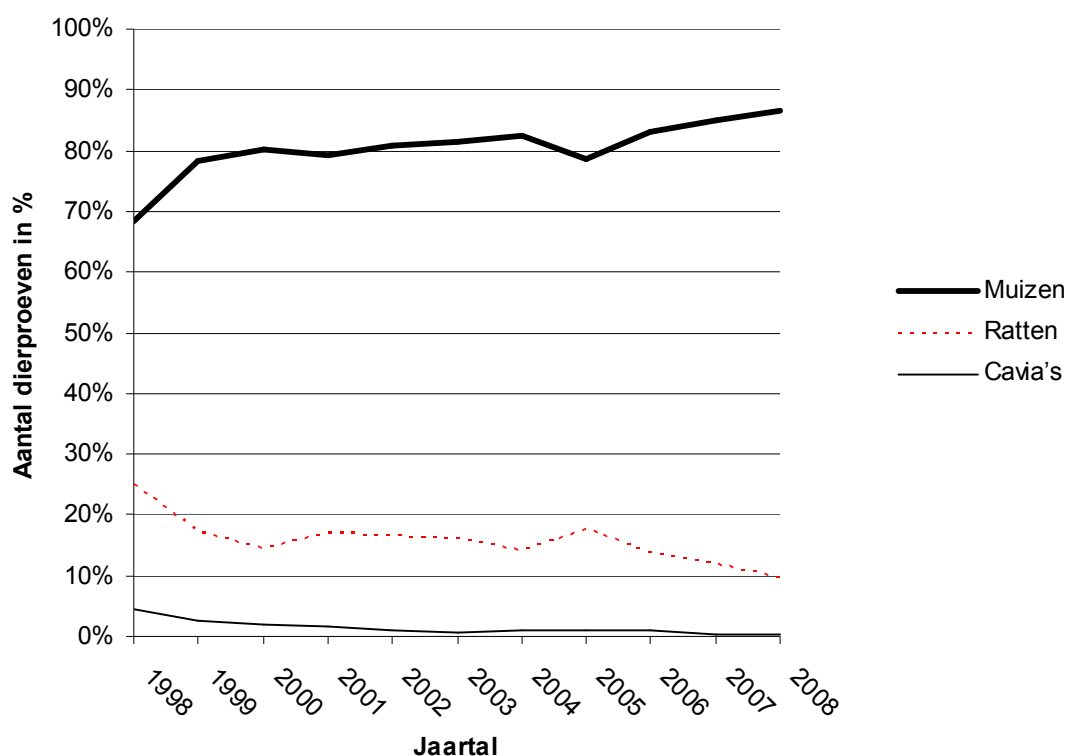
Grafiek 7.9.1 : Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar andere ziekten bij de mens in Nederland van 1998 tot 2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).



Figuur 7.9.2: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar andere ziekten bij de mens (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) in de periode van 1998-2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.9.3 : Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar andere ziekten bij de mens (in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.9.4.: Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar ander ziekten bij de mens (in % van het totaal voor dit doel ) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

### 7.9.3 Suikerziekte

#### Introductie

Suikerziekte of Diabetes mellitus is een complexe aandoening waarvan het kenmerkende ziektebeeld is de verhoogde bloedsuikerspiegel (hyperglycemie) en de uitscheiding van glucose in de urine. Hoewel al bekend in de Oudheid heeft het tot begin vorige eeuw geduurd voordat de rol van de alvleesklier in het ontstaan van suikerziekte duidelijk werd. Historisch in dit verband is het onderzoek van Banting en Best uit 1922 waarbij op grond van onderzoek in honden de betekenis van insuline werd aangetoond. Tegenwoordig worden er 2 vormen van suikerziekte onderscheiden; type 1 of insuline-afhankelijke diabetes (circa 10% van alle gevallen) en type 2 of insuline-onafhankelijke diabetes (circa 90%). De incidentie van beide vormen neemt toe. In 1995 leden wereldwijd circa 135 miljoen mensen aan diabetes, in 2025 wordt verwacht dat dit aantal meer dan verdubbeld is (King et al. 1998)<sup>250</sup>. In de US staat diabetes op plaats zes van doodsoorzaken.

Verondersteld wordt dat Type 1 diabetes een auto-immuunziekte is waarbij insuline producerende cellen in de alvleesklier vernietigd worden door cellen van het immuunsysteem. Toxische of infectieuze prikkels kunnen hieraan ten grondslag liggen, waarbij een genetische predispositie een belangrijke voorwaarde is. Type 1

<sup>250</sup> King H, Aubert RE & Herman WH (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 21: 1212-1231.

diabetes begint vaak al op jonge leeftijd en kenmerkt zich door de hoge frequentie van complicaties die op oudere leeftijd kunnen voorkomen. Destructie van de insuline producerende cellen ontbreekt Type 2 diabetes. Het is een metabole aandoening resulterend in veranderingen in de insuline productie of ongevoeligheid van cellen voor insuline (insuline resistentie). Risico factoren zijn een genetische aanleg, of aspecten als overgewicht, roken, stress. Deze vorm van diabetes ontstaat veelal op latere leeftijd en kenmerkt zich eveneens door hoge frequentie aan complicaties.

### Diabetes en trends in dierexperimenteel onderzoek

Hoewel de kennis over diabetes de laatste jaren is toegenomen, is nog veel onduidelijk, zowel voor Type 1 als Type 2 diabetes. Belangrijke aandachtsgebieden in het diabetes onderzoek zijn de etiologie en pathogenese (wat is de genetische basis van diabetes, wat is het mechanisme achter virale en toxische tiggers), mogelijke interventiestrategieën en de pathofysiologie en behandeling van mogelijke complicaties zoals nephropathy en neuropathy. Diermodellen spelen binnen alle vraagstellingen een belangrijke rol en zullen hieronder kort worden toegelicht.

Voor dit onderzoek naar Diabetes mellitus worden diverse diermodellen gebruikt, ieder vaak met een gevoeligheid voor een specifiek aspect van Type 1 en Type 2 diabetes. Het gaat hierbij om spontane modellen in muis of rat, geïnduceerde diermodellen en (zij het beperkt) transgene diermodellen. Bekende modellen zijn de de BB diabetes prone rat (BBdp), de BB Zucker diabetic rat en de NOD muis, alle drie spontane modellen of de PVG/c rat en Low-dose STZ muis, geïnduceerde diermodellen waarbij inductie heeft plaatsgevonden thymectomie en bestraling of door chemische behandeling<sup>251</sup>. Andere stammen, zoals de Zucker Diabetes Fatty (BZF) rat en de BB Zucker diabetes-resistente stam worden juist gebruikt voor onderzoek naar diabetes gerelateerde complicaties<sup>252</sup>. Interventiestrategieën variëren van de ontwikkeling en evaluatie van specifieke farmaca en (monoclonale) antistoffen, transplantatie van pancreas tot eilandjes van Langerhans tot experimentele behandelingen als het toedienen van stamcellen. Ook voor dit onderzoek wordt vaak van de Bio-Breeding rat en de NOD muis gebruik gemaakt. Voor de routine controle van geproduceerde partijen insuline werd tot voor een aantal jaren geleden de muis convulsie test gebruikt.

Naast de rat en de muis worden incidenteel ook andere diermodellen ingezet. Vanwege de overeenkomsten met de humane fysiologie en pathofysiologie wordt ook het (mini) varken voor diabetes onderzoek (Type 1) gebruikt en dan vooral voor het pre-klinisch onderzoek. Omdat spontane diabetes bij het varken uiterst zeldzaam is moet deze ziekte chemisch of chirurgische geïnduceerd worden. Studies vinden ook plaats met primaten; voor het pre-klinisch onderzoek zoals van immuuntherapeutica maar ook voor experimentele behandelingen als transplantatie van stamcellen of gen therapie.

### Diabetes en trends in 3V onderzoek

Weliswaar niet een alternatief in de strikte betekenis van het woord kan ook het gebruik van vissen genoemd worden. Het gaat hierbij om de Tilapia. Het gaat hierbij

---

<sup>251</sup> Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA & Greiner DL (2004). Rat models of Type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR Journal* 45(3): 278-291.

<sup>252</sup> Tirabassi RS, Flanagan JF, Wu T, Kislauskis EH, Birckbichler PJ & Guberski DL (2004). The BBZDR/Wor rat model for investigating the complications of Type 2 diabetes mellitus. *ILAR Journal* 45(3): 292-302.

vooral om fundamenteel onderzoek. Eilandjes van Langerhans zijn bij deze vis geconcentreerd in een anatomisch discreet orgaan en daarmee goed te isoleren. Een beperkende factor was het verschil in structuur tussen het humane insuline en het vissen insuline. Echter, inmiddels is de Tilapia door genetische modificatie 'gehumaniseerd' wat de waarde van het model heeft doen toenemen.

Ondanks het feit dat er veel diabetes modellen in rat en muis bestaan, blijft extrapolatie van resultaten naar de mens een beperkende factor. In vitro onderzoek met (menselijke) cellen zal daarom in belang toenemen, vooral voor fundamentele vraagstellingen. Het zal hierbij vooral om vooronderzoek gaan waarbij uiteindelijke bevestiging in diermodellen zal moeten plaatsvinden. Het gebruik van stamcellen die kunnen differentiëren naar insuline producerende cellen is in opkomst<sup>253</sup>. Hierdoor zal het makkelijker mogelijk worden fundamentele processen rondom insuline productie, zoals de genetische basis, beïnvloedende factoren en het gebruik van stamcellen voor therapeutische doeleinden in kaart te brengen. Problemen liggen nog wel op het vlak van differentiatie tot volledig functionele beta cellen en in het gedrag van gedifferentieerde cellen waardoor onderzoekers toch terug moeten grijpen op *in vivo* onderzoek.

### 7.9.3 Longziekten (COPD en Astma)

#### Introductie

Onder longziekten worden alle ziekten aan de longen en luchtwegen verstaan. Voorbeelden zijn ziekten aan de respiratoire bovenwegen (bijvoorbeeld verkoudheid), pneumonia (longontsteking), bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), tuberculosis (TB) en astma.

Naast hart-en vaatziekten en kanker zijn longziekten veel voorkomende ziekten en is longziekte een veel voorkomende doodsoorzaak. Voornamelijk chronische longziekten (astma en COPD) zijn een groot probleem in Nederland. Astma is de meest voorkomende chronische ziekte bij kinderen. Astma is een ziekte die ontstaat door allergische reacties. Er zijn verschillende theorieën die het frequent voorkomen van astma proberen te verklaren. Een veel gebruikte verklaring is de hygiëne theorie die stelt dat doordat mensen steeds hygiënischer leven, er vaker allergieën voorkomen die bijvoorbeeld astma veroorzaken<sup>254</sup>.

COPD is een combinatie van emfyseem en bronchitis en ontstaat meestal na het 55<sup>ste</sup> levensjaar. 85% van de mensen die aan COPD lijdt, heeft gerookt of rookt nog steeds. Omdat er 10 tot 20 jaar geleden meer mensen zijn gaan roken en de bevolking steeds ouder wordt, neemt het aantal patiënten met COPD na verwachting toe<sup>255</sup>. Niet alleen in Nederland neemt het aantal gevallen van COPD toe. De WHO voorspelt dat in 2030 COPD de derde doodsoorzaak in de wereld zal zijn na hart-en vaatziekten en herseninfarcten<sup>256</sup>.

---

<sup>253</sup> Peck AB, Yin L & Ramiya V. (2004). Animal models to study adult stem cell-derived, in vitro-generated islet implantation. *ILAR Journal* 45(3): 259-267.

<sup>254</sup> Redd S.C., Asthma in the United States: Burden and Current Theories, *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(4): 557-560

<sup>255</sup> RIVM, Volksgezondheid Toekomst Verkenning, Nationaal Kompas Volksgezondheid. Bilthoven: RIVM, <<http://www.nationaalkompas.nl>> versie 3.19, 24 september 2009

<sup>256</sup> WHO, World Health Statistics, 2008

### Modellen voor het bestuderen van chronische longziekten

Astma wordt bestudeerd door proefdieren een kleine hoeveelheid potentiële allergenen bijvoorbeeld met ovalbumin (eiwit wat voorkomt in kippeneieren) of met extracten van de huisstofmijt, toe te dienen en het dier hierna met hetzelfde allergeen te challengen.

Omdat er veel onderzoek gedaan wordt naar de expressie van eiwitten en genen zijn momenteel transgene muizen de meest gangbare dieren voor onderzoek naar astma. Fysiologisch gezien is de cavia een beter model om allergische reacties te bestuderen. De cavia wordt dan ook al sinds honderd jaar gebruikt voor onderzoek naar allergische reacties in de luchtwegen en is naast de muis een nog veel gebruikt proefdier. Voor onderzoek naar de cellulaire mechanismen en genetische achtergronden van astma zijn cavia's echter minder geschikt omdat er weinig inteeltstammen zijn van cavia's. Mogelijk zullen in de toekomst transgene cavia's gemaakt kunnen worden omdat sinds kort het genoom van de cavia in kaart is gebracht. Tot slot worden er ratten, honden en schapen gebruikt voor onderzoek naar astma<sup>257</sup>.

Ook voor het bestuderen van COPD worden voornamelijk cavia's en muizen gebruikt. COPD kan op een fysiologische manier geïnduceerd worden bijvoorbeeld door blootstelling aan sigarettenrook, bepaalde proteinases (enzymen die eiwitten afbreken), blootstelling aan fijnstofdeeltje (bijv. koolstof deeltjes) en chemische stoffen. Daarnaast bestaan er muizen lijnen die spontaan longemfyseem ontwikkelen en daarom model staan voor COPD. Tot slot wordt voor de bestudering van COPD gebruik gemaakt van transgene muizen. Sommige van deze transgene dieren krijgen longafwijkingen zonder challenge, andere typen missen de enzymen om sigarettenrook af te breken en krijgen sneller symptomen van COPD na een sigarettenchallenge<sup>258,259</sup>.

### Trends m.b.t aantallen dierproeven die gedaan worden bij het onderzoek naar longziekten

#### *Mechanistisch onderzoek*

Er zal naar verwachting meer onderzoek gedaan worden naar longziekten. Vooral bij het mechanistische onderzoek naar longziekten zal het proefdier van belang blijven.

#### *Ontwikkelingen anesthesie*

Bij astma onderzoek ondervinden dieren voornamelijk ongerief bij de challenge met allergenen die zij ondergaan. Het ongerief wat de dieren hierbij ondervinden wordt op matig geschat. Er wordt steeds kritischer gekeken hoe het ongerief van de dieren zoveel mogelijk kan worden beperkt. De ontwikkeling van anesthesie en pijnbestrijding kan bijdragen aan een verminderd ongerief<sup>260</sup>.

#### *Statistische onderbouwing*

De laatste jaren wordt er steeds meer aandacht besteed aan de statistische onderbouwing van het aantal dieren dat gebruikt wordt voor een experiment.

---

<sup>257</sup> Zosky, G. R. and P. D. Sly (2007). "Animal models of asthma." *Clinical & Experimental Allergy* 37(7): 973-988.

<sup>258</sup> Mahadeva, R., Shapiro S.D., Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema, *Thorax* 2002: 57;908-914

<sup>259</sup> Brusselle, G. G., K. R. Bracke, et al. (2006). "Murine models of COPD." *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 19(3): 155-165.

<sup>260</sup> Cochran J.R., Khan A.M., Eldemir O., Xue H., Cua B., Fullmer J., Larsen G.L., Colasurdo G.N., Influence of lipopolysaccharide exposure on airway function and allergic responses in developing mice, *Pediatric Pulmonology*, 2002, 34(4): 2267-277

### *Cellijnen patiënten*

Daarnaast kunnen veel vragen beantwoord worden met cellijnen van patiënten. De cellen die gebruikt worden voor deze cellijnen worden uit spierweefsel van bobden van patiënten genomen.<sup>261</sup>

### *Longweefsel slices*

Verder doet men contractiestudies met longweefselkweken van proefdieren en slachtafval..

### *Slachtafval*

Met behulp van slachtafval van runderen kan men de contractie van cellen onderzoeken. Weefselkweken van de luchtwegen van proefdieren kunnen daarnaast meer inzicht geven in de rol van gladdespiercellen in ontstekingsreacties.

## 7.9.4 Infectieziektenonderzoek

### Inleiding

Infectieziekten zijn ziekten die veroorzaakt worden door de aanwezigheid van pathogene micro-organismen, zoals bacteriën, virussen, schimmels of parasieten. De ziekten worden overgebracht door mens of dier. In dit laatste geval wordt gesproken over een zoönose. Ondanks onze kennis over hygiëne, het beschikbaar komen van antibiotica en antivirale middelen en de mogelijkheden van profylaxe door vaccinatie vormen infectieziekten nog een van de belangrijke thema's in onze gezondheidszorg. Per jaar komen er 5 miljoen nieuwe AIDS patiënten, sterven er 2 tot 3 miljoen mensen aan tuberculose en circa 1,5 miljoen aan malaria. Van alle bedreigende ziekten in de wereld berust de meerderheid op een zoönose. Een recent voorbeeld zijn de pandemieën van de influenza varianten zoals H5N1 (vogelgriep) en H1N1 (Mexicaanse griep). Er zijn redenen om te veronderstellen dat bedreigende infectieziekten in de toekomst vaker zullen voorkomen alsmede het feit dat deze ziekten vaker een pandemische karakter zullen hebben:

- de groei van de wereldbevolking. Deze groei heeft twee consequenties: de noodzaak tot intensivering en schaalvergroting van de voedselproductie en een toename van de infectiedruk, door "crowding", zowel voor mens en dier.
- Ecologische veranderingen; klimaatveranderingen waardoor exotische ziekten bedreigingen worden in de westerse landen (bv. Dengue, malaria, Q-koorts). Daarbij komt dat uitwisseling met gebieden waarin deze pathogenen inheems zijn geïntensiveerd is door toenemende handel en toerisme.

Naast genoemde redenen kan, in relatie tot pathogene bacteriën ook de toenemende resistentie voor antibiotica genoemd worden.

### Infectieziekten en trends in het dierexperimenteel onderzoek

Grofweg worden in het kader van infectieziekten dierproeven verricht voor de volgende onderzoeksvragen:

- fundamenteel onderzoek. Het gaat hierbij vooral om onderzoek naar het pathogene micro-organisme (karakterisatie, sleutelantigenen), de interactie tussen micro-organisme en gastheer (pathogenese, transmissie en

---

<sup>261</sup> Woodruff P.G., Dolganov G.M., Ferrando R.E., Donnelly S., Hays S.R., Solberg O.D., Carter R., Wong H.H., Cadbury P.s., Fahy J.V., Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004, 169(9): 1001-1006

immuunrespons) en de ontwikkeling van therapie of profylaxe (vaccin). Voor deze vraagstellingen is een gevoelig diermodel vereist. Aantallen dieren per proef zijn veelal beperkt.

- preklinisch onderzoek: safety onderzoek en onderzoek naar de farmaco/immuno kinetiek en dynamiek alsmede onderzoek dat hieraan gerelateerd is zoals toedieningsroutes, formuleringen, e.d. (zie hiervoor ook 7.1 en 7.2). Het aantal dieren per experiment is veelal hoog in vergelijking met het fundamenteel onderzoek.
- Surveillance studies in wilde en gedomesticeerde dieren. Het zal hierbij vooral gaan om het monitoren van besmettingsincidentie als waarschuwing voor uitbraken in mens en dier ("One world, one health" van FAO/OIE/WHO<sup>262</sup>).

De aanzet voor het "One world, one health" initiatief werd gegeven op 29 september 2004, tijdens het symposium 'Building interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World', georganiseerd door de Wildlife Conservation Society en de Rockefeller Universiteit (New York). Gebruikmakend van case studies (o.a. Ebola en Aviaire influenza) werd door een groep van deskundigen een lijst van prioriteiten opgesteld die een effectieve bestrijding van levensbedreigende ziekten in de wereld mogelijk moet maken. Het resultaat van deze bijeenkomst was een lijst van 12 aanbevelingen ('The Manhattan Principles') gericht op een holistische benadering ter voorkoming van epidemische en epizootische ziekten met behoud van bestaande eco-systemen, dit ten dienste van de mens, dier en de onderliggende biodiversiteit.

Veel gebruikte diersoorten in het infectieziekten onderzoek zijn de knaagdieren (muis en rat). Daarnaast worden, afhankelijk van de vraagstelling, ook andere diersoorten gebruikt, zoals de fret voor het influenza onderzoek, de transgene muis voor bijvoorbeeld poliomyelitis onderzoek of de primate. De keuze voor de primate als diermodel wordt vaak ingegeven als er geen andere diermodellen beschikbaar zijn, zoals voor het Dengue virus, het West Nile virus of voor TB. Daarnaast wordt de primate vaak in het preklinisch onderzoek gebruikt als 2<sup>e</sup> diersoort. De kanttekening wordt hierbij gemaakt dat door de industrie soms geanticipeerd wordt op een mogelijke vraag door de regelgevende autoriteiten naar data verkregen in deze diersoort. Gepleit wordt voor een situatie waarbij voorafgaand aan het preklinisch onderzoek met regelgevende autoriteiten overleg plaats vindt over de onderzoekstrategie. Naast genoemde diersoorten worden incidenteel ook meer exotische diersoorten gebruikt als bijvoorbeeld de vleermuis, dit vooral in het kader van transmissieonderzoek.

Er wordt een duidelijke tendens geconstateerd te kiezen voor het meest gevoelige diermodel. Het parallel uitvoeren van onderzoek in diverse diermodellen is niet meer aan de orde. Daarnaast wordt in het onderzoek een duidelijke hiërarchie aangebracht in vraagstellingen en wordt onderzoek gebaseerd op de resultaten van voorafgaand studies. Ten slotte heeft het gebruik van transgene diermodellen geleid tot een verbeterde relevantie van het dierexperimenteel onderzoek. Voor het gebruik van genetisch gemodificeerde primaten wordt geen toekomst gezien; deze modellen zijn te duur en te bewerkelijk, zijn ethisch gezien discutabel en het toepassingsgebied voor deze modellen is zeer beperkt.

Geïnterviewden geven aan in de komende jaren geen grote verschuivingen in de omvang van het proefdiergebruik te verwachten zijn. Een toename ligt eerder in de lijn der verwachting, zeker gezien de druk die de emerging diseases op het

---

<sup>262</sup> <http://www.oneworldonehealth.org/>

onderzoek legt. In aansluiting daarop wordt rekening gehouden met verplaatsing van onderzoek naar het buitenland zoals naar de Verenigde Staten en Aziatische landen, vooral als het gaat om het onderzoek met primaten. Toenemende regelgeving van het onderzoek ligt hier, volgens de geïnterviewden, mede aan ten grondslag.

### Trends in het gebruik van 3V alternatieven

Mogelijkheden voor het gebruik van 3V methoden worden in het infectieziekten onderzoek beperkt geacht. Bepaling van markers die als vroege (humane) eindpunten kunnen gelden neemt toe. Dit draagt bij aan een verfijning van het onderzoek. Daarbij kan gedacht worden aan het gebruik van imaging technieken als PET scan, fNMR. Daarnaast maken vooral de imaging methoden een reductie in diergebruik mogelijk omdat ze een longitudinale monitoring van de dieren mogelijk maken. Wel geldt dat het gebruik van deze apparatuur beperkt is vanwege de veiligheidseisen die aan het onderzoek gesteld worden. Vervoer van dieren naar de locatie van meting en de plaatsing in de meetapparatuur maakt gebruik hiervan vaak onmogelijk.

In relatie tot bovenstaande is met betrekking tot verfijning een andere trend te noemen die tegengesteld kan werken op het aspect verfijning. De neiging bestaat om het werken met infectieuze agentia hoger in te schalen in biosafety levels. Huisvesting van proefdieren onder containment restricties legt beperkingen op aan de huisvesting, zoals in isolatoren. Indirect zal dit een negatief effect hebben op het dierwelzijn.

In het fundamenteel onderzoek is ruimte voor het gebruik van weefselkweek technieken. Het gaat hierbij om het beantwoorden van detailvragen, bijvoorbeeld ten aanzien van de pathogenese. Het onderzoek is veelal sturend en aanvullend aan het *in vivo* onderzoek. Vraagstellingen in het pre-klinisch onderzoek zijn veelal gericht op de farmacokinetiek, effectiviteit en veiligheid van anti-virale en anti-bacteriële middelen en vereisen onderzoek in een complex organisme.

Er is een toenemend gebruik van genomics technieken in het infectieziekten-onderzoek, onder andere ten behoeve van vergelijkende pathogenese. Dit heeft een belangrijke spin-off naar de keuze voor het meest relevante diermodel. In de toekomst kan door omics onderzoek een nog scherpere keuze gemaakt worden voor de beste diermodellen, waardoor onderzoek aan minder relevante modellen achterwege kan blijven. Verder kan als alternatief gedacht worden aan mathematische modellering met betrekking tot het verloop van pandemieën al zal de bijdrage van deze modellering vooral hypothese vormend zijn.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Andere ziekten mens

Ongewervelden	Weefselkweek	Immunochemisch	Fysisch-chemisch	Genomics	In silico	Slachthuis	Menselijke vrijwilligers
	XX	XX		XX	X	X	X

*De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing*

## 7.10 Onderzoek naar het gedrag van dieren

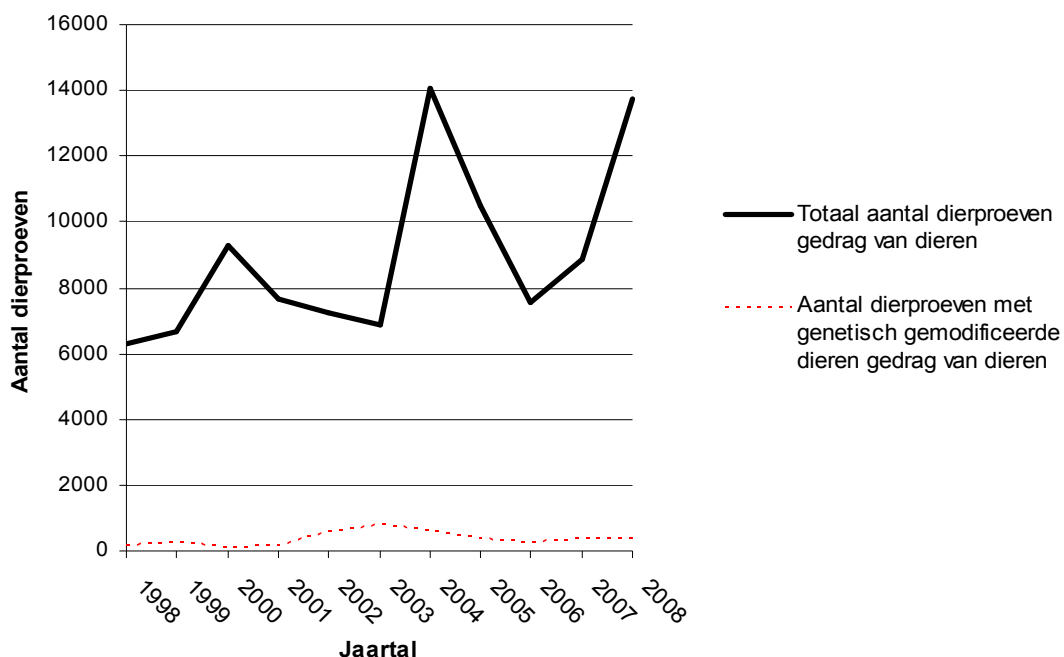
### 7.10.1 *Introductie*

Onderzoek naar gedrag van dieren wordt vaak gecombineerd met fysiologische studies, neurobiologische studies en genetica. Ethologisch onderzoek kan verschillende kaders hebben. Zo kan gedragsonderzoek bij dieren bijdragen aan meer kennis over gedragskenmerken of psychiatrische ziekten bij de mens. In het onderzoek naar stress en adaptatie van dieren probeert men meer te begrijpen over stress gerelateerde ziekten (bijvoorbeeld depressie) of om de relatie tussen verschillende persoonlijkheden met fysiologische kenmerken te bestuderen. Bij onderzoek naar voedsel opname en lichaamsregulatie bij dieren legt men een link tussen metabolisme en gedrag. Dit type onderzoek wordt bijvoorbeeld in verband gebracht met ziekten als obesitas en anorexia. Een derde type onderzoek wat van toepassing is op de mens, is het onderzoek naar geheugenprocessen. Daarnaast kunnen gedragsstudies een onderdeel vormen van veldbiologisch werk. Zo kijkt men bijvoorbeeld hoe dieren in het wild reageren op ecologische stressfactoren in het wild en welke stresshormonen zij daarbij vormen. Verder wordt veel gedragsonderzoek gebruikt voor het verhogen van welzijn van landbouwhuisdieren of proefdieren. Dit onderzoek kan bijdragen aan een optimalisatie van de inrichting van stallen zodat dieren die in gevangenschap leven zoals landbouwhuisdieren en proefdieren minder stress ondervinden bijvoorbeeld door verveling. Een belangrijk aspect van dit type onderzoek is het onderzoek naar reward mechanismen. Hoe krijgt een dier in gevangenschap positieve impulsen voor bepaald gedrag. Zo blijkt bijvoorbeeld dat ratten zich prettiger voelen wanneer zij taken verrichten om toegang te hebben tot voedsel, in plaats van ad libitum (onbeperkt) voedsel tot hun beschikking te hebben. Daarnaast zouden inzichten in genetica, gedrag, stress en persoonlijkheid kunnen leiden tot het fokken met dieren die een persoonlijkheid hebben die beter bestand is tegen gevangenschap en andere stressfactoren. Tot slot probeert men te kijken naar de mechanismen van sociaal gedrag zoals, seksualiteit, agressie en sociale verbintenissen aangaan.

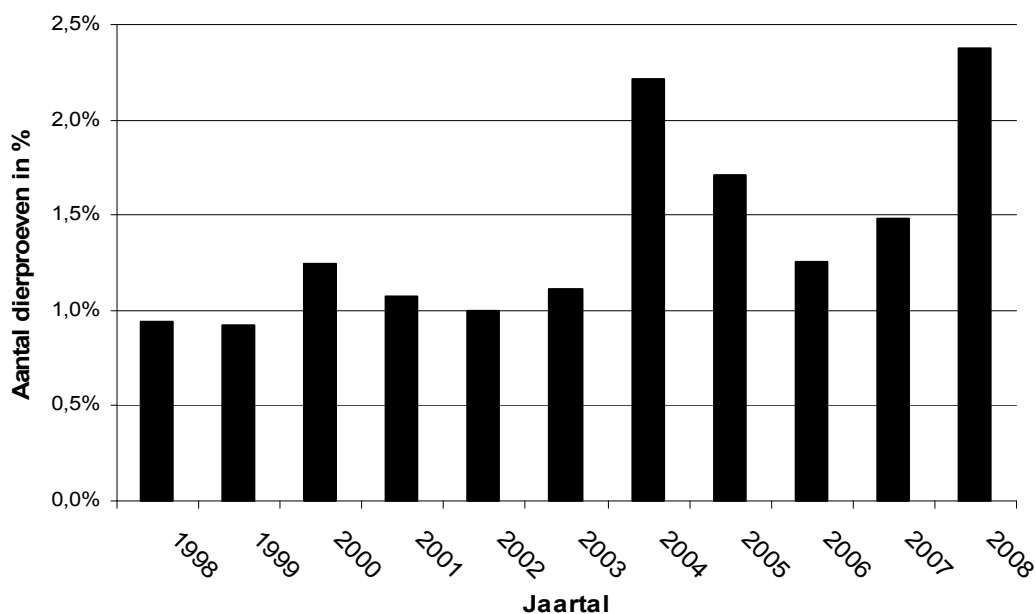
Het ongerief wat dieren bij dit gedragsonderzoek ondervinden, kan sterk variëren. Zo kan bijvoorbeeld een onderzoek naar dierwelzijn bij landbouwhuisdieren meer ongerief veroorzaken dan landbouwhuisdieren in een praktijksituatie ondervinden. Dit komt doordat in deze experimenten vergelijkingen worden gemaakt tussen groepen die onder stressvolle condities worden gehouden, groepen die in een normale praktijk situatie worden gehouden en groepen die onder condities gehouden worden die stress mogelijk verminderen. Bij andere studie, bijvoorbeeld bij studies naar verlatingsangst bij honden waarbij de dieren voor korte tijd alleen worden gelaten door hun eigenaar, ondervinden de dieren nagenoeg geen ongerief.

Naast stressstimuli die mogelijk gebruikt worden om het gedrag van dieren te beïnvloeden en te kunnen bestuderen, kunnen dieren ongerief ondervinden doordat gedragsstudies vaak gecombineerd worden met fysiologische analyses en neurobiologische analyses gedragsstudies zoals hierboven beschreven. Zo wordt er gekeken naar hartslag, lichaamstemperatuur, bloeddruk, hormoonfluctuaties in het bloed, krijgen dieren farmacologische behandelingen, en worden er hersenscans gemaakt en kleine ingrepen in de hersenen verricht.

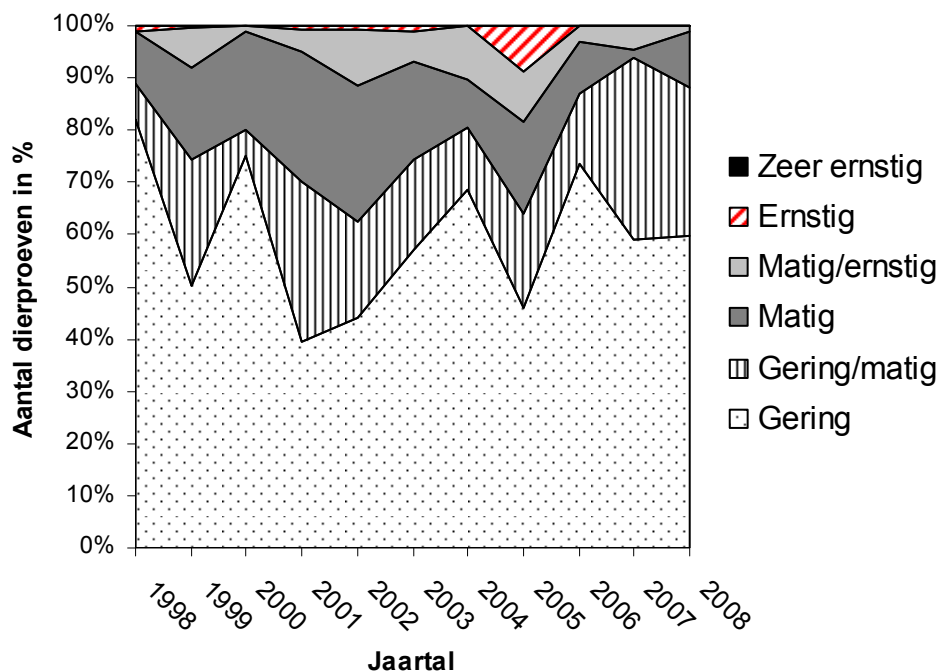
7.10.2 Proefdiergebruik



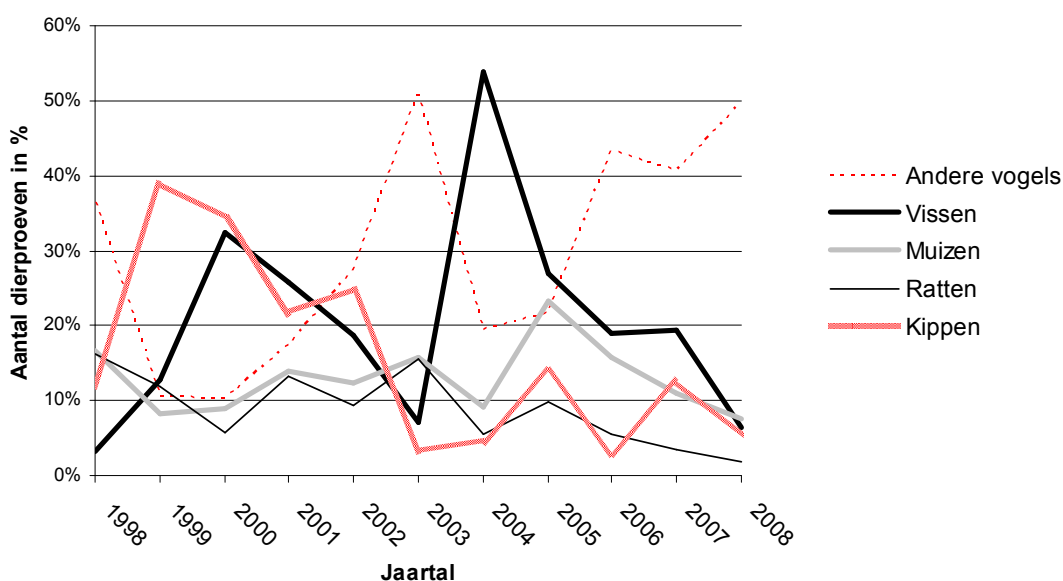
Grafiek 7.10.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar het gedrag van dieren in Nederland van 1998 tot 2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.10.2: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar het gedrag van dieren (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.10.3. Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar gedrag van dieren ( in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998 -2008).



Grafiek 7.10.4. Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar het gedrag van dieren (in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron Zo doende 1998 – 2008).

### 7.10.3 Trends

#### Trends proefdiermodellen

##### *Meer aandacht voor variatie tussen individuele dieren*

Er wordt steeds meer aandacht besteed aan variatie tussen individuele dieren binnen het gedragsfysiologisch onderzoek. Belangrijke drivers voor deze aandacht zijn de

genetica en epigenetica (expressie veranderingen van genen door omstandigheden). Daarnaast is men geïnteresseerd in individuele fitness: welke genetische aspecten en omstandigheden zorgen er voor dat een individu niet ziek wordt. Centraal hierbij staat hoe het laboratorium dier zich verhoudt tot het dier in het wild. Bij de beantwoording van sommige wetenschappelijke vragen is het namelijk een nadeel dat er weinig variatie in populaties laboratorium ratten zit. Bijvoorbeeld wanneer men geïnteresseerd is in agressiviteit geeft een populatie proefdieren met een grote variatie in gedrag zoals aan het ene uiterste dieren die nauwelijks agressief gedrag vertonen aan het andere uiterste zijn dieren die erg agressief zijn een valider beeld. In tegenstelling tot populaties in de natuur is deze variatie in gedrag niet aanwezig in laboratorium dieren omdat zij bijvoorbeeld gefokt zijn op hanteerbaarheid. Deze aandacht voor variatie brengt met zich mee dat er soms meer dieren gebruikt worden dan in andere typen onderzoek waar juist gestreefd wordt naar een kleine variatie<sup>263</sup>. Uiteindelijk kunnen deze inzichten echter gebruikt worden om betere modellen te ontwikkelen die model kunnen staan voor gedragsaspecten van de mens.

### *Genetische gemodificeerde muizen minder gebruikt*

Gedragsfysiologen zijn voorzichtig met het gebruik van knock out muizen. Dit omdat men heeft ondervonden dat als van twee verschillende strains laboratorium ratten hetzelfde gen uitgeschakeld wordt, dit resulteert in verschillende effecten in beide strains. Verder is men vooral geïnteresseerd naar bepaalde veranderingen in een specifiek gebied in een specifiek orgaan omdat zo ziekteprocessen in de natuur ontstaan. In de gedragsfysiologie is men daarom meer en meer bezig met inducible tissue specific transgenese. Hierbij worden als het dier volwassen is bepaalde genen aan of uit gezet in een specifiek gebied<sup>264</sup>. Men kan overexpressie of onderexpressie in bepaalde hersengebieden induceren met behulp van virale vectoren die genen aan of uit zetten.

### *Trends met betrekking tot stijging en daling van het aantal gebruikte proefdieren:*

Mogelijk zou het epigenetische onderzoek een stijging met zich mee kunnen brengen. Hierbij wordt gekeken naar de effecten van verzorgingsstrategieën van moederdieren of het succes van hun jongen. Dit vergt veel dieren omdat er vergelijkingen tussen nesten gemaakt wordt en nestgenoten van proefdieren waar gedragsanalyses en andere analyses aan worden gedaan ook geregistreerd worden.

Meer onderzoek naar welzijn landbouwhuisdieren en vissen in aquasystemen. Vooral dit laatste onderzoek kan een stijging veroorzaken van het aantal proefdieren. Vissen worden in aquacultuur in vrij grote dichtheden gehouden.

### *Verfijning*

Men verwacht dat telemetrie en imaging technieken zich verder zullen ontwikkelen: Dit is niet altijd een verbetering voor het dier maar het levert wel een wetenschappelijke verfijning op. Er kan zo meer inzicht verkregen worden over biologische processen door maar een dier te gebruiken.

Daarnaast leidt meer kennis over gedragsfysiologie voor een vergroting van het welzijn van proefdieren. Tussen gedragsfysiologen en proefdierkundigen is weinig interactie. Mogelijk worden nieuwe inzichten vanuit de gedragsfysiologie hierdoor niet ingezet om de situatie voor proefdieren te verbeteren.

---

<sup>263</sup> Benus R.F., Bohus B., Koolhaas J.M., Oortmerssen G.A., Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1991, 47(10):1420-9071

<sup>264</sup> Havekes R., Nijholt I.M., Visser A.K.D., Eisel U.L.M., Van der Zee E.A., Transgenic inhibition of neuronal calcineurin activity in the forebrain facilitates fear conditioning, but inhibits the extinction of contextual fear memories, *Neurobiology of Learning and Memory*, 2008, 89(4) 595-598

### Vervanging

Onderzoekers gebruiken vaker evertibraten als drosophila's (fruitvliegen) voor gedragsfysiologisch onderzoek. Het onderzoek met behulp van fruitvliegen en andere evertibraten beperkt zich tot het onderzoek naar mechanismen die al vroeg op de evolutionaire ladder aanwezig waren (zoals honger, seksuele drang en slaap).<sup>265, 266</sup> Complexere fysiologische interactie tussen het hormonale stelsel, het cardiovasculaire systeem en het centrale zenuwstelsel kunnen niet bij fruitvliegen bestudeerd worden.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Gedrag Dieren

	Ongewer- velden	Weefsel- kweek	Immuno- chemisch	Fysisch- chemisch	Mol.biol methoden	Slachthuis	Menselijke vrijwilligers
	X				XX		

De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing

## 7.11 Wetenschappelijke vraag naar ziekten bij het dier

### 7.11.1 Introductie

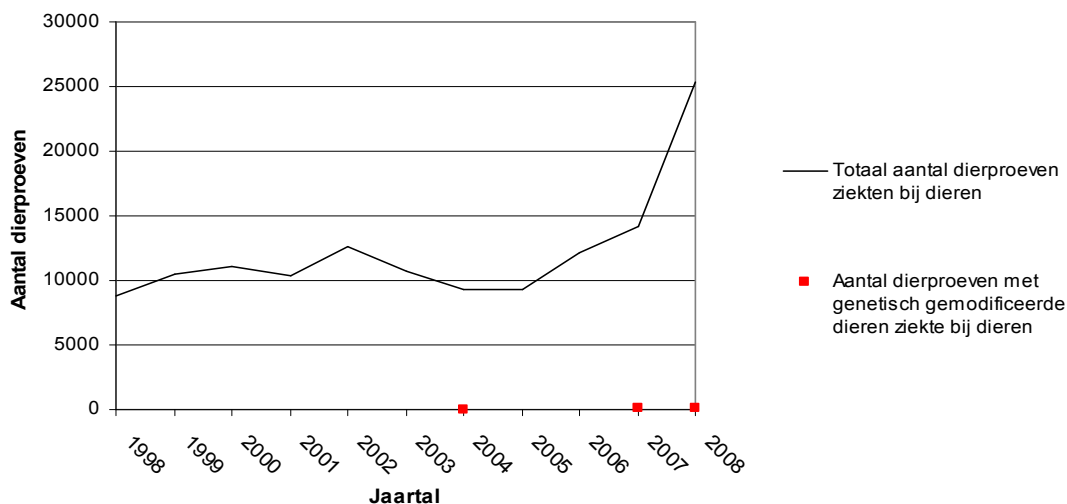
Onderzoek ten behoeve van ziekten bij het dier omvat een breed scala aan ziekten. Ten eerste zijn er veel interacties met het humane gezondheidsonderzoek. Zo zijn gezelschapsdieren die spontaan kanker krijgen van belang voor het humane kanker onderzoek. Bij landbouwhuisdieren ligt de nadruk voornamelijk op onderzoek naar infectieziekten zoals zoönosen en antibiotica resistentie. Verreweg de meeste dierproeven worden gedaan met landbouwhuisdieren en dan met name met kippen (zie grafiek 7.11.4).

Het percentage dierproeven uitgevoerd voor een wetenschappelijke vraag naar ziekten bij het dier schommelt tussen de 1,5 en 5,5 procent van het totaal aantal dierproeven ( zie grafiek 7.11.1 en 7.11.2). In 2008 was er een stijging te zien in het aantal dierproeven uitgevoerd tbv een wetenschappelijke vraag naar dierziekten. Deze stijging was het gevolg van onderzoek naar de Aviaire Influenza ofwel de vogelpest (Zo doende 2008) . Dit onderzoek vond voornamelijk plaats in wilde vogels.

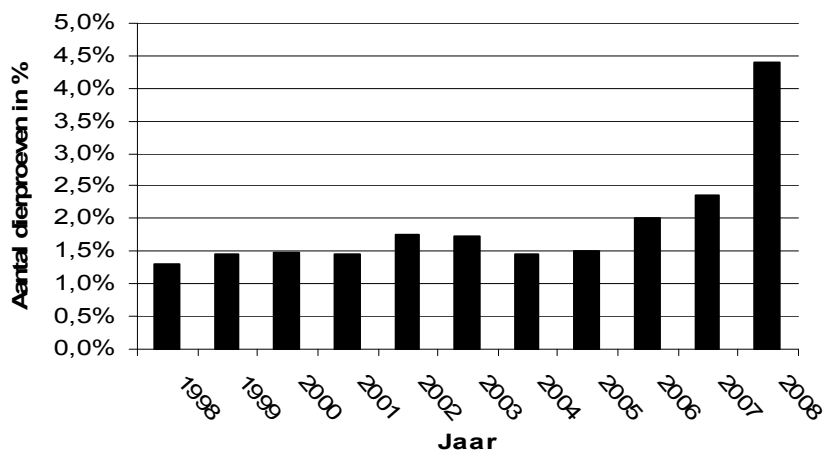
<sup>265</sup> Stoleru D., Peng Y., Agosto J., Rosbash M., Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*, *Nature*, 2004, 431(7010): p862-868

<sup>266</sup> Kubli E., Sex-peptides: Seminal peptides of the *Drosophila* male, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003,60(8), 1689-1704

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik

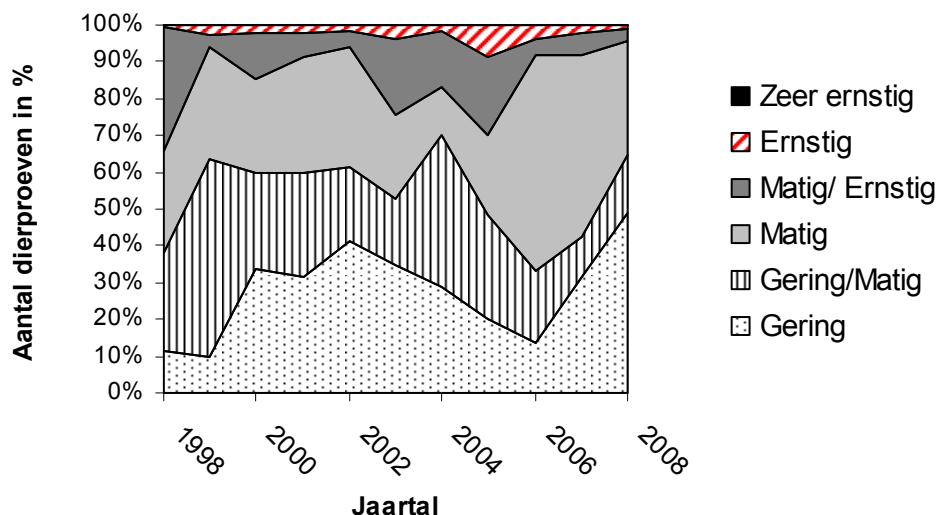


Grafiek 7.11.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar ziekten bij dieren in Nederland van 1998 tot 2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).



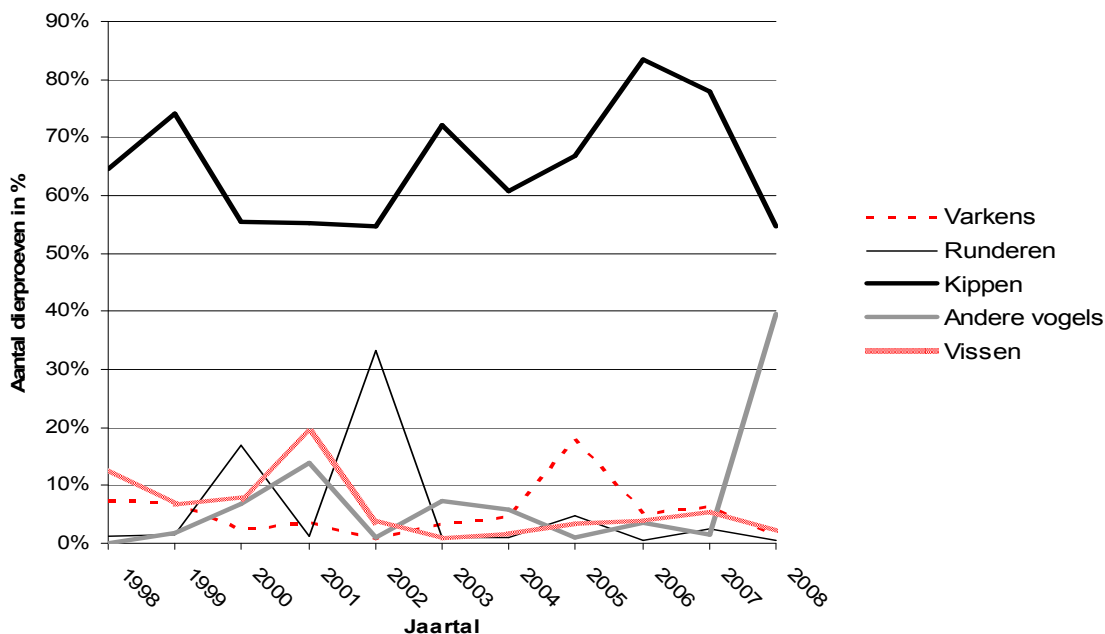
Grafiek 7.11.2: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar ziekten bij dieren (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

Het onderzoek wat proefdieren ondervinden bij onderzoek naar ziekten bij dieren fluctueert (grafiek 7.11.4). Zo ondervond in 2008 49 % van de proefdieren gering, 16 % gering matig, 31 % matig, 3 % matig/ ernstig en 1% ernstig ongerief.



Grafiek 7.11.3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar ziekten bij het dier (in % van het totaal van dit doel) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Kippen, varkens, runderen, vissen en andere vogels zijn de belangrijkste diersoorten die gebruikt worden bij onderzoek naar ziekten bij dieren. De kip is de meest gebruikte diersoort. Dit houdt mogelijk verband met de manier van huisvesting van kippen. Vaak vindt onderzoek met kippen in een situatie plaats die vergelijkbaar is met de praktijk in de landbouw, waarbij veel dieren samen in een ruimte gehuisvest zijn.



Grafiek 7.11.4: Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar ziekten bij het dier (in % van het totaal voor dit doel) in Nederland van 1998-2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Onderzoek naar ziekten met dieren wordt voornamelijk uitgevoerd door Wageningen Universiteit, Universiteit Utrecht en private instellingen ten dienste van landbouw en diergeneeskunde. Met uitzondering van 2008 waarbij Erasmus Universiteit veel

“Andere vogels” heeft gebruikt, voeren de andere universiteiten slechts sporadisch met een beperkt aantal proefdieren onderzoek uit naar ziekten bij het dier.

### 7.11.2 Genoemde trends

Zoals gezegd vormt het onderzoek naar infectieziekten en het gevaar van zoonosen een belangrijk onderdeel van het onderzoek met proefdieren ten behoeve van een wetenschappelijke vraag m.b.t. dierziekten. Mogelijk worden infectieziekten een groter probleem in de toekomst bijvoorbeeld door globalisering<sup>267</sup>, klimaatverandering,<sup>268</sup> en schaalvergroting van de voedselproductie<sup>269</sup>. Het wordt waarschijnlijk geacht dat infectieziekten bij het onderzoek t.b.v. een wetenschappelijke vraag m.b.t. dierziekten een belangrijk zwaartepunt zal blijven en mogelijk belangrijker zal worden.

Daarnaast wordt verwacht dat het onderzoek naar dierziekten een steeds belangrijker imput zal geven aan het humane onderzoek. Huisdieren krijgen vaak dezelfde chronische ziekten als mensen onder andere door leefstijl factoren als hoog calorische diëten en te weinig beweging en hoge leeftijd<sup>270</sup>. Informatie uit spontane ziektemodellen van chronische ziekten kan dan ook informatie geven die voor het humane gezondheidsonderzoek van belang is.

Verder zullen ook in het onderzoek t.b.v. dierziekten omics technologieën en systeembioïologie van steeds groter belang worden. Daarbij zullen naast dierproeven, *in silico* modellen en *in vitro* modellen gebruikt worden en zullen kleine dieren als de muis mogelijk model staan voor andere dieren. Andere belangrijke technieken zijn beeldvormende technieken. Tot slot zullen mogelijk in de toekomst stamceltechnieken een belangrijker rol gaan spelen in het onderzoek naar dierziekten.

Overzicht gebruik Vervangingsalternatieven Ziekten bij het dier.

	Ongewervelden	Weefselkweek	Immunochemisch	Fysischemisch	Mol.biol methoden	Slachthuis	Menselijke vrijwilligers
		XX	XX		XX		

De score verloopt van X tot XXX waarbij X staat voor beperkte toepassing en XXX voor ruime toepassing

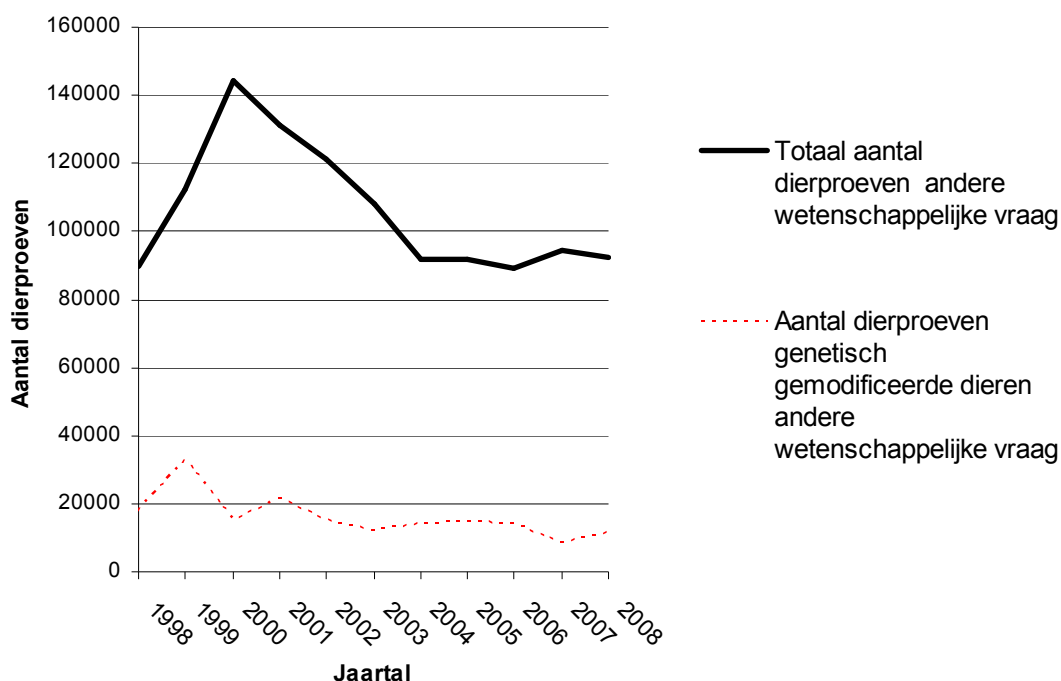
<sup>267</sup> Wilson, M.E., Travel and the emergence of infectious diseases. *Emerging infectious diseases* 1 (2) Pages 39-46  
<sup>268</sup> Harvell, C.D., Mitchel, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dpobson, A.P., Richard, O.S., Samuel, M.D., Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota, *Science*, 2002, 296(5576):2158-2163  
<sup>269</sup> Daszak, P., Cunningham, A.A., Emerging Infectious Diseases of Wildlife: Threats to Biodiversity and Human Health, *Science* 287(5452): p443-550  
<sup>270</sup> Rand, J.S., Fleeman, L.M., Farrow, h.A., Appleton, D.J., Lederer, R., Canince and feline diabetes Mellitus: Nature of nurture? *Journal of Nutrition*, 2004, 134(8): 2072S-2080S

## 7.12 Onderzoek voor een andere wetenschappelijke vraag

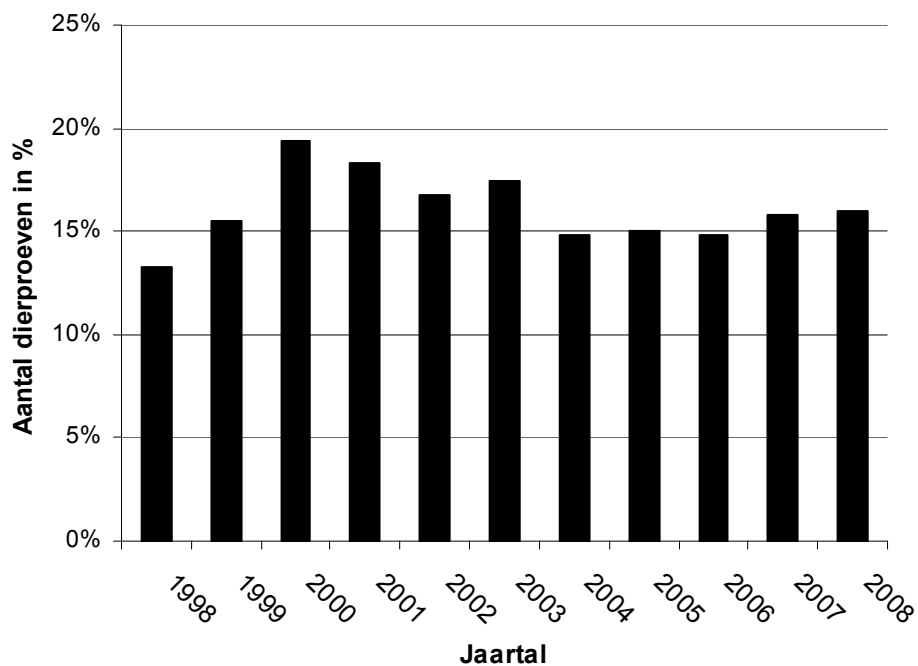
### 7.12.1 Introductie

Dierproeven waarvan het onderzoek niet onder de in de hiervoor behandelende hoofdstukken valt, wordt geregistreerd als onderzoek wat gedaan wordt ter beantwoording van een andere wetenschappelijke vraag. Volgens de respondenten blijkt de scheidslijn tussen deze categorieën en andere categorieën als onderzoek ter beantwoording van een ziekte bij de mens arbitrair. Vaak wordt zeer fundamenteel onderzoek wat uiteindelijk kan bijdragen aan meer begrip van een ziekteproces onderzoek geregistreerd onder een andere wetenschappelijke vraag. Ander onderzoek zoals onderzoek naar biomechanische processen van dieren (bijvoorbeeld hoe vliegt een vogel) of veldbiologisch onderzoek staat wel op zichzelf. Hier zullen trends met betrekking tot veldbiologisch onderzoek behandeld worden.

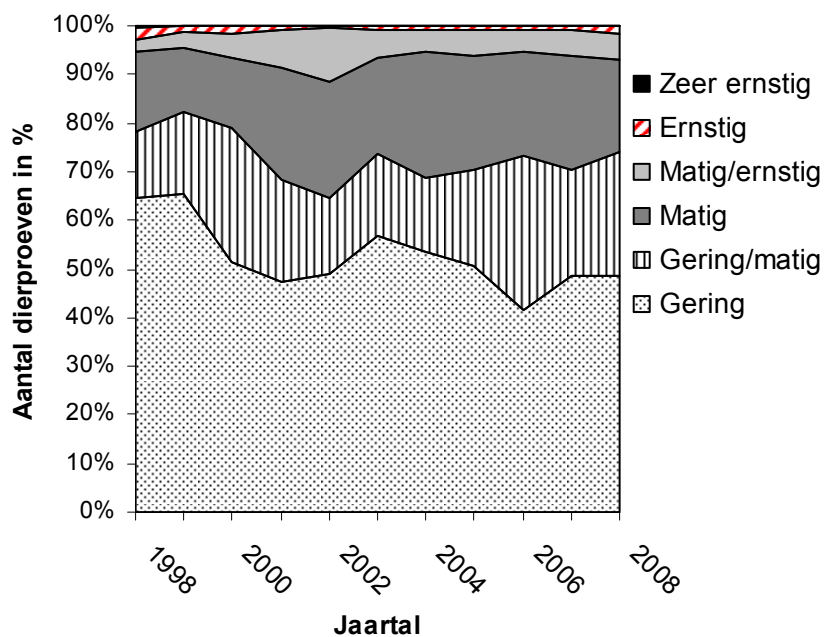
### 7.12.2 Proefdiergebruik onderzoek voor een andere wetenschappelijke vraag



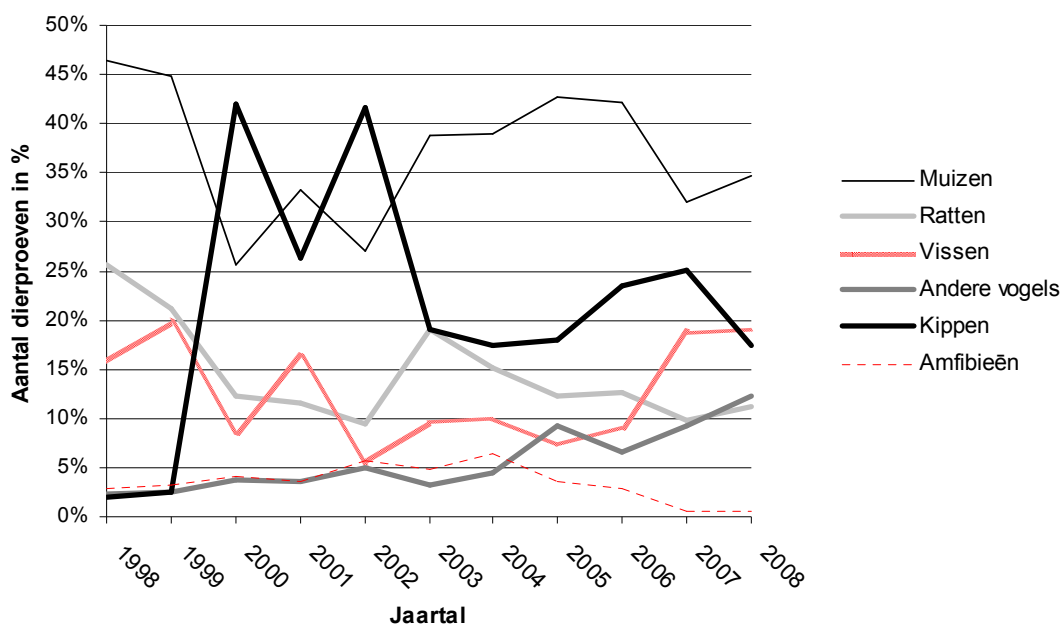
Grafiek 7.12.1: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van een andere wetenschappelijke vraag in Nederland van 1998 tot 2008. Daarnaast wordt het aantal dierproeven met genetisch gemodificeerde dieren getoond (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.12.2: Aantal dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar een andere wetenschappelijke vraag (in % van het totaal aantal dierproeven in Nederland) van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998- 2008).



Grafiek 7.12.3: Aantal dierproeven uitevoerd in het kader van onderzoek naar een andere wetenschappelijke vraag (in % van het totaal van dit doel) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998- 2008).



Grafiek 7.12.4: Belangrijkste diersoorten gebruikt bij dierproeven uitgevoerd in het kader van onderzoek naar een andere wetenschappelijke vraag van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998 tot 2008).

### 7.12.3 Voorbeeld andere wetenschappelijke vraag: veldbiologisch onderzoek

#### Introductie

Bij veldbiologisch onderzoek probeert men dierecologische vragen te beantwoorden. Daarbij wordt de relatie bestudeerd van het dier en zijn natuurlijke omgeving. Men probeert de verspreiding van dieren en het gedrag van dieren te verklaren aan de hand van factoren en strategieën van het dier die invloed hebben op de selectiedruk. Zo wordt er gekeken naar de omgeving (voedsel, territorium en predatie), fysiologische kenmerken (bijv energie verbruik, immunologie en hormonen ) en de interactie met soortgenoten. Men kijkt voornamelijk naar vogels, omdat deze gemakkelijk waar te nemen zijn en omdat er gebruik gemaakt kan worden van een netwerk van vrijwilligers. Daarbij wordt gekeken naar aantallen, biomedische kenmerken en gedrag. Steeds vaker worden en ook technieken gebruikt als DNA analyse, analyse van stabiele isotopen (kennis over voedsel), stereometrie en immunologie.

Een voorbeeld is onderzoek naar broedstrategieën van nestkastbroeders. De broedperiode is een dure periode voor vogels. Vogels moeten veel energie en tijd in hun jongen steken. Daarom is deze periode interessant om strategieën te onderzoeken die kunnen bijdragen aan een succesvolle voortplanting. Zo kan meer inzicht gekregen worden in natuurlijke selectie processen. Een vrouwtje kan bijvoorbeeld kiezen hoeveel eieren zij kan leggen afhankelijk van de hoeveelheid voedsel die er beschikbaar is en hoe zwaar de voorgaande winter voor haar is geweest. Zo kan gekeken worden onder welke omstandigheden, een bepaalde broedgrote optimaal is. Daarnaast wordt gekeken naar de seksratio van broedsels. Een vrouwtje kan bepalen of zij mannelijke kuikens of vrouwelijke kuikens krijgt<sup>271</sup>.

<sup>271</sup>Smith C.A. et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken *Nature* 461, 267-271; 2009

Hoewel er ook gekeken wordt naar het gedrag van dieren in dit type onderzoek, valt het merendeel van het veldbiologisch onderzoek onder een andere wetenschappelijke vraag en niet onder een wetenschappelijke vraag met betrekking tot gedrag van dieren. Begrip van gedrag is niet de uiteindelijke doelstelling van dit type onderzoek. Het is eerder een parameter om meer te begrijpen van ecologische en evolutionaire processen. Als er echt ethologisch onderzoek gedaan wordt, waarbij de tijdsindeling van individuele dieren bestudeerd wordt, is dit om te kijken naar energiegebruik en voedselinname en andere parameters die inzicht geven in strategieën die invloed hebben op selectie druk.

### Wettelijk kader

In principe valt al het veldbiologisch onderzoek waarmee een wetenschappelijke vraag beantwoordt wordt en waarmee de te bestuderen dieren ongerief ondervinden onder de wet op de dierproeven. Het aantal proefdieren wat in veldbiologisch werk wordt gebruikt, is volgens de respondent substantieel gestegen. Dit komt doordat er vaker ouderschapsanalyse plaats vindt door DNA te analyseren. Hiervoor wordt uit de vleugelen of neven bloed afgenomen. Hierdoor val meer veldbiologisch onderzoek onder de Wod.

Het alleen observeren van dieren valt niet onder de Wod. In de Staatscourant 109 van 9 juni 1988 is in het veldbiologisch onderzoek het criterium 'invasief' van toepassing verklaard om een handeling als dierproef te beschouwen. Dit betekent dat handelingen als het vangen en ringen van vogels niet als dierexperiment worden aangemerkt. Dit wijkt af van overig dierexperimenteel onderzoek waarbij 'mogelijk ongerief' het criterium is.

Bij de registratie van veldbiologisch onderzoek wordt een onderscheid gemaakt tussen dieren die geregistreerd staan als "Uit de wilde fauna" en dieren die geregistreerd staan als "in het vrij veld". Dieren die gevangen en vervoerd worden naar een laboratorium setting en daar verzorgd worden vallen daarbij onder "Uit de wilde fauna". Dieren waarbij de vangvallen regelmatig gecontroleerd worden maar die in de natuurlijke omgeving blijven worden geregistreerd als "in het vrije veld" (zie kengetallen paragraaf 7.12.3.4).

### Trends

#### *Trends met betrekking tot aantallen:*

Veldbiologisch werk verschilt van onderzoek. Bij veldbiologisch onderzoek is er geen sprake van experimentele groepen met een zo klein mogelijke variatie (genetisch, voer etc). Er is sprake van een groep dieren met een grote genetische variatie die onder wisselende omstandigheden leven. Hierdoor zijn meer dieren nodig om hypothesen statistisch te kunnen ondersteunen. Daarnaast is er nooit van te voren bekend hoeveel dieren er uiteindelijk aan een studie mee doen. Men schat van te voren hoeveel dieren er gevangen gaan worden of aanwezig zullen zijn in een bepaald ecosysteem. Dit wordt voorgelegd aan de DEC. Uiteindelijk wordt het geschatte aantal gecorrigeerd nadat de studie heeft plaats gevonden. Een ander verschil vormt de registratie van hergebruik bij dieren. Binnen het veldbiologisch onderzoek worden populaties jaren gevolgd. Vogels leven lang en sterven in het wild.

Het kan dus voorkomen dat er meerdere keren aan een dier handelingen worden verricht over een aantal jaren heen. Pas als het dier sterft kan met zekerheid worden vastgesteld hoe vaak een dier is “hergebruikt”.

Onderzoekers zijn steeds geïnteresseerder in het seksen van dieren en in stambomen van dieren. Hiervoor is DNA onderzoek nodig. Dit DNA onderzoek vindt plaats door kleine hoeveelheden bloed af te nemen uit de nekvene of vleugelvene. Hierdoor vallen meer studies onder de Wod en is het aantal gebruikte proefdieren substantieel gestegen de laatste zes jaar. De interesse in seksuele selectie is de laatste jaren gegroeid omdat er meer bekend is geworden over paringsgedrag van vogels en er zo meer wetenschappelijke interesse is ontstaan. Bijvoorbeeld men heeft onlangs nieuwe ontdekkingen gedaan met betrekking tot het paringsgedrag van kemphanen. Mannelijke kemphanen zijn seksueel dimorf. In het broedseizoen hebben de mannetjes lange veren en opvallende kleuren. Men dacht dat mannelijke kemphanen in twee fenotyperingen voorkwamen. De dominante mannetjes met donkere veren en de subdominante mannetjes met iets lichtere veren. Echter nu lijkt er een derde type te zijn die er uitziet als een vrouwtje en partners steelt van de dominantere mannetjes. Dit is pas gebleken naar DNA onderzoek. De mogelijkheden van genetica zijn daarbij de stuwende factor. Dit geeft inzicht in gedrag, voortplanting en verschil tussen soorten.

### *Vervanging*

Er is binnen het veldbiologisch onderzoek veel lang lopend onderzoek. Men verandert dus niet gauw van soort. Sommige vragen kunnen met evertrebraten worden bestudeerd, echter deze hebben als nadeel dat zij moeilijker waar te nemen zijn in het wild en er dus moeilijk een link te leggen is naar natuurlijk gedrag. Bovendien is het gedrag van bijvoorbeeld insecten minder complex.

### *Vermindering*

Vermindering van het aantal proefdieren is lastig. Vaak weten onderzoeker niet hoeveel dieren zij over de jaren heen zullen vangen. Daarom vangen zij vaak wanneer dit kan. Men probeert wel een inschatting te maken van te voren en verhoogd dit dan met 10 % bij decaanvragen. Vaak komen de aantallen dan niet boven het bij de DEC aangevraagde aantal proefdieren uit. Later worden de aantallen het gecorrigeerd met de echte vangst.

### *Verfijning.*

Er zijn nieuwe technieken in omloop die voor verfijning van veldbiologische zorgen. Men streeft er daarbij na om zo weinig mogelijk de dieren te verstoren door aanwezigheid van mensen en om de dieren zo weinig mogelijk te vangen om zo het natuurlijk gedrag van de dieren zo veel mogelijk te behouden en om mogelijke stress te voorkomen. Dit doet men met name met webcams, pressive infra tac (PIT)(zendertjes vergelijkbaar met zendertjes in huisdieren waar gegevens opgeslagen staan via een nummer wat gescand kan worden) en radiozendertjes met een constant signaal. De ontwikkeling van radiozendertjes is nog niet optimaal. Deze zendertjes worden op veren geplakt of door middel van harnasjes aan de dieren gehangen. De batterijen gaan naar van loop van tijd leeg, dus na een bepaalde tijd vallen de zendertjes van de dieren af. Naast de batterijen zijn de ontvangststations een probleem. Deze stations zouden op veel plaatsen moeten worden geplaatst om constant een signaal te kunnen ontvangen. Dit is in de praktijk nog niet realiseerbaar. Er zijn wel ontwikkelingen gaande met zonnecelletjes op zendertjes en zendertjes die zo geprogrammeerd zijn dat zij soms een signaal uitzenden om de batterijen te besparen. De ontwikkeling van de zendertjes geeft veel nieuwe informatie

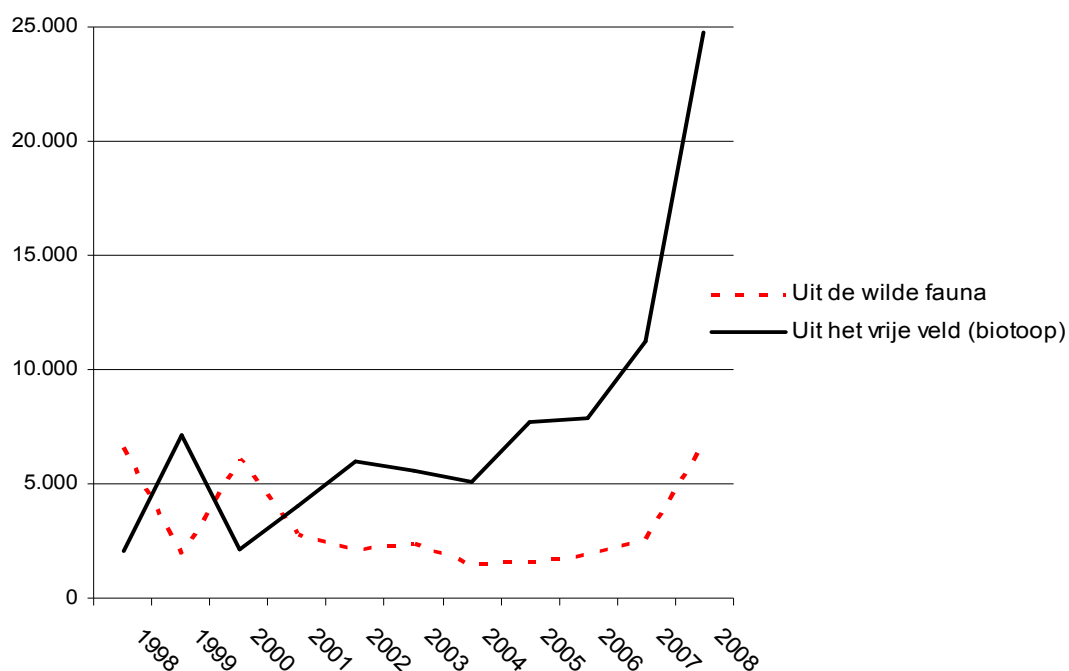
bijvoorbeeld kan men zo kijken wie er bij een voerbak komt, kan men de trek van zeeschilpadden volgen en kan men het gewicht volgen van mezen.<sup>272</sup>

### *Trends Diersoorten*

Er zijn volgens de respondenten geen trends met betrekking tot de diersoorten die gebruikt worden. Vogels zijn vooral praktisch omdat zij gemakkelijk waar te nemen zijn en door het netwerk van amateurs.

### Kengetallen dieren uit de wilde fauna of het vrije biotoop

De meeste dierproeven met dieren uit de wilde fauna of het vrije biotoop komen, worden gebruikt voor een andere wetenschappelijke vraag (Zie grafiek 7.12.5, 7.12.6 en 7.12.7

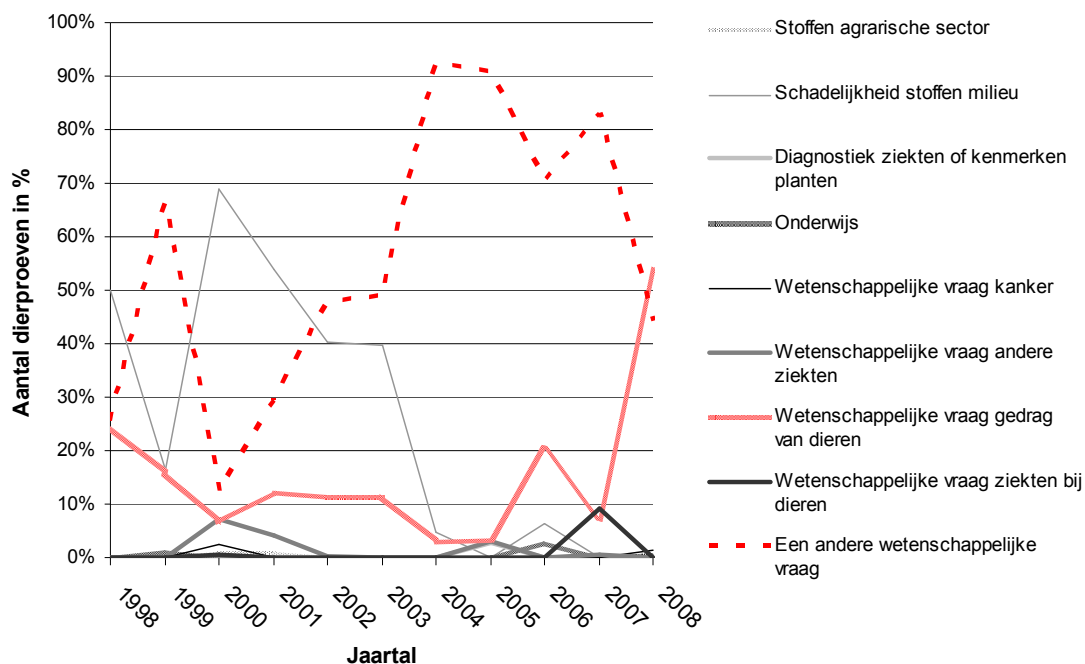


Grafiek 7.12.5 : Aantal dierproeven met dierproeven uit de wilde fauna van en uit het vrije veld (biotoop) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron Zo doende: 1998 -2008).

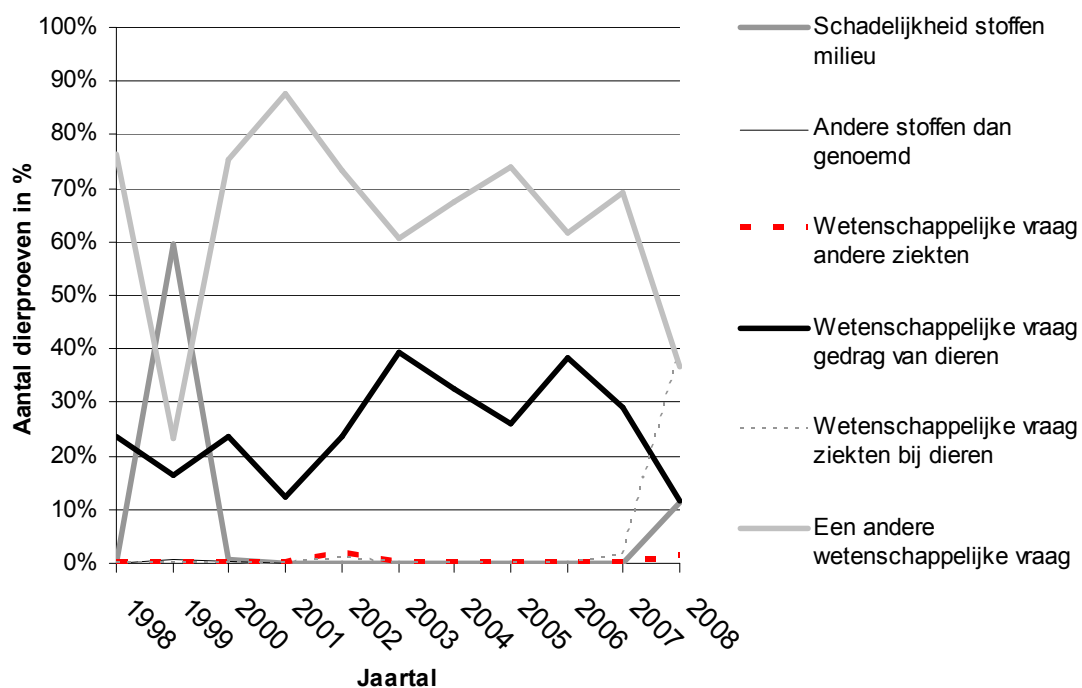
---

<sup>272</sup> Cooke S.J., Hunch S.G., Wikelski M., Andrews R.D., Kuchel L.J., Wolcott T.G., Butler P.J., Biotelemetry: A mechanistic approach to ecology, *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(6):334-343

## 7 Beschrijvingen trends per toepassingsgebied proefdiergebruik



Grafiek 7.12.6: Aantal dierproeven met proefdieren verkregen uit de wilde fauna per de van toepassing zijn de sub-doelstellingen (in % van het totaal aantal dierproeven met proefdieren uit de wilde fauna in Nederland ) van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).



Grafiek 7.12.7: Aantal dierproeven met proefdieren verkregen uit het vrije veld (biotoop) per de van toepassing zijnde sub-doelstellingen (in % van het totaal aantal dierproeven met proefdieren uit het vrije veld in Nederland) van 1998 tot 2008 in Nederland (Bron: Zo doende 1998-2008).

### 7.13 Overzicht gebruik vervangingsalternatieven in de categorieën van onderzoek

In de onderstaande tabel wordt een globaal overzicht gegeven van veel gebruikte vervangingsalternatieven in de verschillende categorieën onderzoek waarvoor dierproeven worden verricht.

Categorie onderzoek	Type vervangingsalternatief							
	Ongewervelden	Immunochemisch	Fysisch-chemisch	In silico	Slachthuis material	Menselijke vrijwilliger	genomics	Weefselkweek
Biologische producten		XXX	XXX			X	X	XXX
Geneesmiddelen	X	X	XX	XXX		XX	XXX	XXX
Toxicologie	XX		XX	XXX	X	X	XXX	XXX
Diagnostiek		XXX	X				XX	
Onderwijs				XXX	XX	XX		
Kanker onderzoek		XX				X	XXX	XXX
Hart- en vaatziekten					X		XX	XXX
Geestesziekten							XX	X
Ziekten ZCS	X					XX	X	XX
Andere ziekten mens	X	XX		X	X		XX	XX
Gedrag dier	X						XX	
Ziekten dier		XX					XX	XX

## 8 Trends in rapport

In de voorgaande hoofdstukken is een overzicht gegeven van ontwikkelingen en trends in de domeinen Proefdieren, Dierproeven en Alternatieven voor dierproeven. Beschreven trends zijn zeer divers en kunnen leiden tot een toename of afname in het proefdiergebruik of tot een toename of afname van het welzijn van gebruikte proefdieren. Trends verschillen ook in dominantie, dat wil zeggen in de impact die ze zullen hebben in de periode tot 2020, Om een onderscheid in mate van dominantie te maken zijn een 3-tal criteria benoemd:

- Uitstraling naar onderzoeksdisciplines. Hieronder wordt het multi-disciplinaire belang van een trend aangeduid. Zo worden AV middelen (Geavanceerde virtuele modellen) praktisch alleen aangewend binnen het onderwijs terwijl het gebruik van embryonale stamcellen op vele terreinen van het onderzoek toepassing vinden en ontwikkelingen binnen het ene terrein van onderzoek invloed kunnen hebben op ontwikkelingen binnen een ander terrein.
- De haalbaarheid. Hieronder wordt de realiseerbaarheid van de trend bedoeld binnen de periode tot 2020. Zo wordt verwacht dat de trend 'systems biology' geen concrete modellen zal opleveren vòòr 2020, de trend Intelligent Testing Strategies zal dit, zo is de verwachting, wel doen.
- Het effect op het proefdiergebruik. Dit effect kan een toename of afname in het proefdiergebruik zijn, of een toename of afname van het ongerief van de dieren in experiment. Afname van aantallen dieren of van ongerief wordt in de overzichten aangegeven met een naar beneden gerichte pijl (↓) terwijl een toename van het proefdiergebruik of van ongerief wordt aangeduid met een omhooggerichte pijl (↑).

Aan ieder aspect kan een score van 1 tot 3 worden toegekend, waarbij 3 een maximaal effect is en 1 een minimaal effect, dit binnen de periode tot 2020. De totaalsom van iedere trend geeft de mate van dominantie aan waarbij 9 het maximaal haalbare is. Dit resulteert onder andere tot een inschatting van systems biology op 7 waarbij geldt dat systems biology als zodanig een bijzonder relevante trend is, echter met een beperkte impact vòòr 2020.



## 8.1 Domeingebied Proefdieren

Ontwikkeling/trend	Verwachting 2020	Belemmerende factoren	Mate van dominantie		
			A	B	C
<b>Verhogen relevantie diermodellen</b> Maken, fokken en gebruiken van genetisch gemodificeerde dieren	Opheldering genoom van belangrijke proefdiersoorten, uitgebreide beschikbaarheid van GM lijnen en opslag mutanten in cryo-banken Gericht gebruik GM dieren voor specifieke vraagstellingen	Beperking GM lijnen tot voornamelijk muis, rat en vis Kosten m.b.t. genereren GM model (tijd en geld) Wetenschappelijke beperkingen GM lijnen (relevantie)	3	3	3 ↑
Gerichtere keuze diermodel door gebruik genomics	Langzame progressie. Ontwikkelingen in het bijzonder op het terrein van nieuwe diermodellen en voor specifieke vraagstellingen.	Praktische haalbaarheid (kosten/baten) Inzicht in genetische basis van te bestuderen fenomeen niet altijd duidelijk	3	2	2 ↑
Beperking gebruik specifieke diersoorten (primaat, hond/kat)	Uitgebreide motivatie noodzakelijk voor toestemming gebruik. Voortgaande centralisatie primatenonderzoek in Nederland. Toename kosten onderzoek door aanpassing huisvesting & verzorging	Praktische haalbaarheid centralisatie (onderzoek op afstand) Toename voor (preklinisch) onderzoek door verschuivingen in aanbod te onderzoeken stoffen (therapeutische Mabs)	1	3	1 ↓
Toename gebruik vissen	Toenemend gebruik o.a. door GM. Toename blijft echter beperkt en vooral binnen specifieke onderzoeksgebieden: fundamenteel onderzoek, ontwikkelingsbiologie, visvaccins en eco-tox.	Noodzaak in het dierenlab tot het hebben van aquaria Ontbreken specifieke kennis en vissen geen traditioneel laboratoriumdier	2	2	2 ↑
<b>Maximalisatie informatie per dier</b> Toename niet-invasieve meetmethoden (beeldvormende technieken)	Ruimere toepassing in breedte onderzoek Optimalisatie technieken (betere aflezing) en data analyse	Blijvende hoge kosten Plaatsing apparatuur in dierenlab Spanningsveld tussen vermindering en verfijning	2	3	2 ↓
Toename real-time monitoringssystemen	Ruimere toepassing in breedte onderzoek Optimalisatie (miniaturisatie en parallelle frequenties) technieken en data analyse	Spanningsveld tussen vermindering en verfijning	1	3	2 ↓
<b>Verfijning proefdiegebruik</b> Vermindering ongerief	Daling % proeven ernstig ongerief Kritischer houding DEC's t.a.v. experimenten met ernstig ongerief Toenemend gebruik humane eindpunten en ontwikkeling van pre-klinische biomarkers Optimalisatie gebruik pijnbestrijding	Spanningsveld tussen wetenschappelijke eindpunten en ongerief Wetenschappelijke beperkingen in ontwikkelingen pre-klinische biomarkers	3	3	2 ↓
Maximalisatie welzijn	Toenemend onderzoek naar invloed ongerief op experimentele resultaten Verdere optimalisatie huisvesting en verzorging	Discussie over relatie verfijning en invloed onderzoeksresultaten			

## 8 Trends eindrapport

<b>Overige</b>					
Revisie Council Directive 86/609/EEC	Implementatie en operationalisering wetgeving Toename aandacht en monitoring welzijn, 3Vs, ethische afweging, procedures	Politiek beslissingsproces over acceptatie Vertaling Europese wetgeving naar Nederlandse wetgeving en effect overige EU landen	3	2	2 ↓
Export onderzoek	Toenemende internationalisering onderzoek in de vorm van samenwerkingsverbanden of uitgevoerd door multi-nationals Locatie uitvoering dierproeven strategisch gestuurd	Kwaliteit dierexperimenteel onderzoek en aanwezige expertise in Nederland hoog	2	2	1
Educatie en training	Criteria voor scholing leden DECs, bij- en nascholing art.9 en 12 Ruimere aandacht attitudevorming	Behoudendheid onderzoekswereid	3	2	2 ↓
Overtolligheid en ongeschiktheid dieren	Toenemende aandacht vanuit maatschappij en beleid, aandachtsgebied vanuit de revisie van Council Directive 86/609/EEC Overlegstructuren fok en gebruikers (binnen instellingen met eigen fok) en centralisatie fok Gebruik cryopreservatie voor opslag niet gebruikte lijnen Agendapunt voor DECs	Spanningsveld tussen afstemming fok en gebruikers Toenemend gebruik GM dieren (i.h.b. meervoudig transgeen)	1	2	2 ↓

Dominantie wordt bepaald door: uitstraling naar onderzoeksdisciplines (A), haalbaarheid < 2020 (B), effect op proefdiergebruik (stijging of daling; meer of minder ongerief) (C), Gradering van 1 – 3: 1 = gering en 3 = significant

## 8.2.1 Domeingebied Dierproeven

Ontwikkeling/trend	Verwachting 2020	Beïnvloedende factoren	Dominantie trend		
Toename dierproeven			A	B	C
REACH (van start gegaan in 2007)	Het programma moet zijn beëindigd. Duidelijkheid moet verkregen zijn over het gebruik van proefdieren. Tevens moet er duidelijkheid zijn over de status van alternatieve testbenaderingen als ITS, Tiered Testing e.a.	Uitloop van het programma omdat deadlines niet gehaald worden Onduidelijkheid over informatie aanwezig bij producenten Problemen rondom risico-evaluatie deel stoffen Voortgaande ontwikkeling	1	3	3 ↑
Nanomaterialen	Gebruik van nanomaterialen voor ontwikkeling van innovatieve en intelligente in vitro methoden Sterke toename gebruik nanomaterialen in samenleving en als gevolg daarvan vraag naar veiligheidsaspecten van nanomaterialen	Onduidelijkheid over waarde diermodel voor beoordeling veiligheid	2	2	?
Risico acceptatie	Toenemende vraag maatschappij (en politiek) naar veilige producten Grotere aandacht risicobeoordeling en andere strategieën voor risicobeoordeling	Risico perceptie is aan beeldvorming onderhevig. Maatschappelijke aandacht kan beleidsbeïnvloedend werken en additioneel onderzoek initiëren	3	3	2 ↑
Prioriteiten gezondheidsonderzoek	Sterke toename van onderzoek i.h.b. life style ziekten Ontwikkeling van personalized medicines, diversificatie in behandelingsmethoden en toenemend gebruik mAbs	Prioriteiten sterk gerelateerd aan trends in leefwijze en het optreden van gezondheidsincidenten Veiligheidsevaluatie nieuwe geneesmiddelen leidt tot aanvullende regulering	2	2	3 ↑
Translatieel onderzoek	Toenemend aantal onderzoeksprogramma's Strategische samenwerkingsverbanden en toename Multidisciplinair onderzoek	Verschuivende culturen preklinisch en klinisch onderzoek kunnen belemmerend werken bij een optimale uitwisseling	2	2	1 ↑

Dominantie wordt bepaald door: uitstraling naar onderzoeksdisciplines (A), haalbaarheid < 2020 (B), effect op proefdiergebruik (stijging of daling; meer of minder ongerief) (C), Gradering van 1 – 3: 1 = gering en 3 = significant

## 8.2.2 Domeingebied Dierproeven

Ontwikkeling/trend	Verwachting 2020	Beïnvloedende factoren	Dominantie trend		
Afname dierproeven			A	B	C
Experimentele opzet en statistiek	Geinstitutionaliseerde aandacht voor literatuur onderzoek, experimentele opzet en statistiek	Beschikbaarheid (bio-)statistici	3	2	1 ↓
Kritische evaluatie bestaande diermodellen	Periodieke 'doorlichting' van routinematig dierexperimenteel onderzoek Toenemende aandacht relevante diermodellen	Traditie in het laboratorium en regelgeving kunnen belemmerend werken Doorvoeren aanpassingen in regelgevend onderzoek noodzakelijk	2	3	2 ↓
Wijzigingen onderzoeksstrategieën	1. Stofgerelateerde tailor-made' onderzoeksprotocollen 2. Ruime aandacht voor mechanistisch onderzoek. Implementatie hiervan in Tiered testing protocollen 3. Implementatie voor relevante producten, beginnend met humane vaccins	Nieuwe teststrategieën kunnen tot additionele onderzoeksvragen leiden 1. Acceptatie door regelgevende instanties 2. Acceptatie door regelgevende instanties Wetenschappelijke beperkingen 3. Acceptatie door regelgevende instantie			
Dierproef als confirmatie model	Doorlopend proces.	Voortgang wordt gestuurd door wetenschappelijke mogelijkheden en ingeval van regelgevend onderzoek door acceptatie regelgeving	3	2	3 ↓

Dominantie wordt bepaald door: uitstraling naar onderzoeksdisciplines (A), haalbaarheid < 2020 (B), effect op proefdiergebruik (stijging of daling; meer of minder ongerief) (C), Gradering van 1 – 3: 1 = gering en 3 = significant

## 8.3 Domeingebied Vervangingsalternatieven voor dierproeven

Ontwikkeling/trend	Verwachting 2020	Beïnvloedende factoren			Dominantie trend		
		A	B	C	A	B	C
<b>Ongewervelde organismen</b> Vervanging gewervelde dieren door ongewervelde organismen	Vervanging beperkt aantal dierf testen door ongewervelde organismen, o.a. gebruik in eco-toxiciteit onderzoek vaak op basis van tiered testing approach						
Opname enkele subsoorten ongewervelden in Europese regelgeving 86/609/EEC					3	1 ↓	
<b>Immuno-chemische en fysisch-chemische technieken</b> Optimalisatie bestaande technieken en ontwikkeling nieuwe technieken	Technieken gevoeliger en breder toepasbaar. Toenemend gebruik als screeningsmethode (farmaceutisch onderzoek, toxicologie) of als vervanging proefdiergebruik (hormoonpreparaten, vaccincontrole),				2		3 ↓
Acceptatie door regelgevende autoriteiten	Grotere acceptatie				nvt		3 ↓
<b>In silico modellen</b> AV-middelen	Beschikbaarheid meer en interactieve programma's, virtuele trainingsmogelijkheden						
Data bestanden	Links tussen data-bestanden en efficiënter gebruik bestaande literatuur. Betera onderbouwing keuze en opzet experimental design				1		1 ↓
QSAR modellen	Verbeterde data-input, mathematische modellering en categorisering van stoffen.				1		1 ↓
Physiological-based biokinetics (PBBK)	Grotere relevantie PBBK modellen door invoer van kwalitatief goede data, beschikbaarheid modelstoffen, verbeteringen in mathematische modellering, in vitro technieken, blootstellingsgegevens, etc.				1		2 ↓
<b>Slachthuis materiaal</b> Gebruik van slachthuis materiaal	Gebruik zal beperkt blijven						
Gebruik van FCS	Toenemende vervanging van FCS door serum van andere diersoorten of serumvrije media				1		1 ↓
<b>Menselijke vrijwilligers</b> Menselijke vrijwilligers	Toenemend aantal experimenten met menselijke vrijwilligers.						
Micro-dosering	Toenemend gebruik van micro-dosering gecombineerd met optimalisatie				2		1 ↓

## 8 Trends eindrapport

	meetmethoden en analyse data	Vooronderzoek (in vivo of in vitro) zal noodzakelijk blijven	2	1 ↓
<b>Genomics technologieën</b>				
Gebruik diverse -omics technologieën zoals transcriptomics, proteomics, metabonomics, etc	Toegenomen technologische kennis die routinematige uitvoering van diverse -omics technieken mogelijk maken. Optimalisatie Bioinformatica (data verwerking en analyse)	Kosten aspect	2	2 ↓
Gebruik genomics voor diagnostiek en behandeling	Identificatie relevante genen als biomarker voor verfijning diagnostiek en daaraan gerelateerd behandeling	Onduidelijkheid over rol genen en initiatie voor aanvullend onderzoek	2	1 ↓
Onderzoek naar gen sequenties en functionaliteit genen in diverse diersoorten	Opheldering genoom relevante proefdiersoorten en aanvullend onderzoek naar functionaliteit genen	Werkomvang	2	3 ↓
Gebruik genomics als op breed terrein van onderzoeksdisciplines, zowel fundamenteel als toegepast. Eveneens toepassing genomics in welzijnsonderzoek dieren	Groter inzicht in cellulaire mechanismen en groter arsenaal van vroege biomarkers Snellere testen	Onderzoek zal in eerste instantie hypothese vormend zijn en additioneel dierexperimenteel onderzoek initiëren	3	2 ↓
Combinatie genomics en weefselkweek modellen	Standaard gebruik genomics bij weefselkweek onderzoek waardoor relevantie van weefselkweek onderzoek wordt vergroot	Mogelijkheden genomics onderzoek beperkende factor	3	2 ↓
<b>Systeem Biologie</b>				
Integratie data sets verschillende proefdiervrije methoden	Groter inzicht in integratie relevante in vivo, in vitro, in silico en fysisch-chemische methoden	Complexiteit van integratie kan onderschat worden	3	1 ↓
<b>Weefselkweek</b>				
Gebruik humane cellen	Grotere beschikbaarheid humane cellen	Afhankelijk van bereidheid artsen om weefsels beschikbaar te stellen Kwaliteit weefsels niet optimaal Individuele variatie weefsels en onbekende historie verwacht geen	2	2 ↓
Gebruik stamcellen in totale breedte van het onderzoek	Technische kennis over functionele differentiatie stamcellen. Succesvolle kweek stabiele cellen. Grotere beschikbaarheid adulte stamcellen	Technische problemen kunnen weerbarstiger zijn dan verwacht	3	3 ↓
Gebruik co-culturen	Standaard toepassing van in vitro modellen waarin interactie tussen verschillende celtypen	geen	2	2 ↓
Tissue engineering	Beschikbaarheid van relatief simpele functionele 3D weefsels structuren, vorderingen op het gebied van meer complexe structuren Beschikbaar komen van geschikte matrixen Integratie van nanotechnologie ien constructie structuren	Beperkingen aan fysiologische functionaliteit	3	2 ↓

Dominantie wordt bepaald door: uitstraling naar onderzoeksdisciplines (A), haalbaarheid < 2020 (B), effect op proefdierebruik (stijging of daling; meer of minder ongerief) (C), Gradering van 1 – 3: 1 = gering en 3 = significant

## 9 Samenvatting en conclusies

In 2008 werden in Nederland 578.123 dierproeven uitgevoerd. In de 25 lidstaten die de Europese Unie in 2005 kende bedroeg dit aantal circa 12.1 miljoen. Cijfers over het wereldwijde proefdiergebruik zijn niet voorhanden, maar ruwe schattingen komen uit op tenminste 115 miljoen<sup>273</sup>. Hoewel deze cijfers in het niet zinken bij de aantallen dieren die jaarlijks worden gehouden in de bio-industrie, staat het onderwerp Dierproeven midden in de maatschappelijke discussie. Zo levert invoeren van het trefwoord 'Animal testing' in Google meer dan 12 miljoen hits op. Activiteiten op Europees niveau die direct invloed hebben op het proefdiergebruik zoals de REACH wetgeving en de herziening van de Europese wetgeving op het gebied van dierproeven kunnen onveranderlijk op massale aandacht rekenen. Enquêtes onder de bevolking laten zien dat mensen geneigd zijn kritisch te oordelen over het gebruik van dieren voor onderzoeksdoeleinden. Het geven van aanvullende informatie over doel en opzet levert veelal een oordeel op dat meer nuances kent<sup>274</sup>.

De problematiek rondom dierproeven is complex, kent vele invalshoeken en wordt gevoed door uiteenlopende belangen. Een zinvolle en evenwichtige discussie over dit onderwerp is gediend met een maximum aan informatie en een minimum aan subjectieve beeldvorming. Het belang hiervan wordt onderkend in de Kabinetsvisie Alternatieven voor dierproeven. Het voorstel van het Ministerie van VWS tot het uitvoeren van een studie naar ontwikkelingen en trends in het proefdiergebruik en in het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven kan in dit licht als een belangrijke aanzet worden gezien. Een analyse naar ontwikkelingen en trends op het terrein van dierproeven en alternatieven voor dierproeven draagt bij aan de breed gedragen behoefte aan transparantie en openheid, het bevordert een objectieve informatie voorziening, het geeft inzicht in verantwoordelijkheden, het benoemt nieuwe trends of beschrijft verschuivingen in bestaande trends en, indien noodzakelijk, maakt het mogelijk alert en zelfs pro-actief op deze ontwikkelingen te reageren.

De formele opdracht van VWS tot de trendanalyse is in 2008 aan ZonMw gegeven. Door ZonMw is de studie opgedeeld in een maatschappelijke en een wetenschappelijke deel, met als richtjaar 2020. Dit rapport beschrijft de resultaten van de wetenschappelijke trendanalyse. Trends of ontwikkelingen die een maatschappelijke achtergrond hebben worden beschreven in de maatschappelijke trendanalyse uitgevoerd door de groep van Prof.dr. de Cock Buning van de Vrije Universiteit Amsterdam.

De wetenschappelijke trendanalyse heeft uit drie onderdelen bestaan: een digitale enquête, interviews met deskundigen en een literatuurstudie. De digitale enquête is in Nederland verstuurd naar 275 onderzoekers, vergunninghouders, proefdierkundigen, onderzoeksverenigingen, NGO's en biotechnici met het verzoek deze in te vullen en zo mogelijk door te sturen aan collega's en andere betrokkenen. Door 20% van de aangeschrevenen werd de enquête ingevuld en geretourneerd. Hoewel laag, is het percentages respondenten in lijn met die welke veelal bij enquêtes wordt gezien. Besloten is, ondanks het beperkte belang, de resultaten van de enquête toch mee te nemen in de rapportage. Allereerst omdat sommige respondenten de mening vertegenwoordigden van een instituut of afdeling en verder

---

<sup>273</sup> Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. (2008). Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Altern.Lab.Anim.* 36(3): 327-342.

<sup>274</sup> Aldhous P, Coghlan A, Copley J (1999). Let the people speak. *New Scientist*, 22 : 26 – 31

vanwege de indicatieve waarde die aan de resultaten kan worden toegekend. Voor de studie zijn verder een 50-tal deskundigen uit onderzoek en beleid bevraagd over ontwikkelingen en trends op het gebied van proefdieren, dierproeven en alternatieven voor dierproeven. Deskundigen werden geselecteerd op grond van hun specifieke expertise of omdat ze een centrale rol vervulden in relevante organisaties. Trends en ontwikkelingen die uit de interviews naar voren kwamen zijn voor zover mogelijk onderbouwd met gegevens uit wetenschappelijke publicaties. Ten slotte zijn resultaten van de studie besproken in een workshop met vertegenwoordigers uit het veld.

Om redenen heeft de trendanalyse zich gericht op alle gebieden van het onderzoek en onderwijs. Tot op heden is er noch nationaal, noch internationaal een systematische analyse uitgevoerd naar ontwikkelingen op het gebied van proefdieren, dierproeven en alternatieven voor dierproeven. Als start van het trendonderzoek leek het de opstellers dan ook opportuun de uitgangssituatie te schetsen en de gehele breedte van het onderzoek in de analyse te betrekken. Bij volgende studies kan gebruik gemaakt worden van deze gegevens om een nadere analyse op een selectie van aandachtsterreinen uit te voeren. Consequentie van de brede insteek is dat in de korte projectperiode van 9 maanden veel informatie verzameld diende te worden. Hierdoor werden beperkingen gesteld aan de mogelijkheid om voor ieder terrein van het onderzoek meerdere deskundigen te interviewen, om diepgaande literatuurstudies uit te voeren en om te detaillistisch te zijn in de beschrijving van trends.

Centraal in dit rapport staan de ontwikkelingen en trends in de domeinen Dierproeven en Alternatieven voor dierproeven. Het domein Proefdieren is hieraan als afzonderlijke entiteit toegevoegd met als doel beide waarden die aan het proefdier worden toegekend; een instrumentele en een morele, duidelijk voor het voetlicht te brengen. Het 2<sup>e</sup> deel van het rapport gaat in op de afzonderlijke doeleinden van het proefdiergebruik zoals benoemd in de Wet op de dierproeven (art. 1). Per toepassingsgebied wordt een korte beschrijving van karakteristieken van proefdiergebruik gegeven, wordt in grafieken informatie verschaft over het proefdiergebruik in de afgelopen jaren en worden ontwikkelingen en trends met betrekking tot proefdieren, dierproeven en 3V alternatieven samengevat. Ten slotte zijn aan het rapport een aantal bijlagen toegevoegd die met betrekking tot specifieke onderwerpen en verdere verdieping of aanvullende informatie geven.

### **9.1 Ontwikkelingen en trends**

In de voorgaande hoofdstukken is verslag gedaan van de ontwikkelingen en trends binnen de domeinen Proefdieren, Dierproeven en 3V alternatieven. Niet alles is benoemd kunnen worden en wat benoemd is, is tekort gedaan in tekst en detail. Niettemin geven de uitgewerkte ontwikkelingen en trends een goed beeld van wat er in de komende jaren zal spelen binnen de benoemde domeinen.

De beperkte aandacht geldt zeker voor het onderzoek dat een fundamenteel karakter draagt. Veel heeft dit te maken met de grote diversiteit en verscheidenheid in onderzoekspecialisaties binnen de disciplines van het fundamenteel onderzoek, met de grote diversiteit aan onderzoeksmodellen en met het beperkte routinematige karakter van deze modellen. Toegepast onderzoek kent vaak een wettelijke basis en is meer routinematig van opzet. Daardoor lijkt het bijvoorbeeld dat 3V alternatieven veel meer spelen binnen het toegepast onderzoek dan binnen het fundamenteel onderzoek. De indruk is echter dat dit beeld niet correct is. Allereerst is fundamenteel onderzoek per definitie de kraamkamer voor de ontwikkeling van alle vervangingsalternatieven. Daarnaast worden in het fundamenteel onderzoek vervangings methoden vaak niet in relatie gebracht met 3V alternatieven maar met een wetenschappelijke noodzaak.

Het geheel overziend zouden de volgende kernzinnen kunnen worden gebruikt om de ontwikkelingen en trends samen te vatten:

- *'Less animals, more data'* : de duidelijke tendens om door de introductie van innovatieve technieken als beeldvormende apparatuur, telemetrie of genomics de hoeveelheid informatie per dier te maximaliseren. Hierdoor zal het veelal mogelijk worden het aantal dieren per experiment te verminderen en de relevantie van het onderzoek te vergroten. Introductie van innovatieve technieken zal leiden tot een toenemend multi-disciplinair karakter van het dierexperimenteel onderzoek. Kanttekening is dat een groter beslag gelegd op het individuele dier waardoor er een spanningsveld kan ontstaan tussen vermindering en verfijning.
- *'Happy animals make good science'* : achterliggende gedachte is dat gezondheid en welzijn van het proefdier van invloed zal zijn op de kwaliteit van het onderzoek. Aspecten die hieraan bijdragen zijn goede educatie en training en een wetgeving die de kaders aangeeft waaraan adequate verzorging en welzijn van proefdieren moet voldoen. Ook de toenemende aandacht voor toepassing van pijnbestrijding en humane eindpunten valt onder deze categorie.
- *'Be humane, but get the results'* : deze kernzin kan als de drijvende kracht achter de ontwikkeling van 3V alternatieven worden gezien. Het geeft ook het dilemma weer waarvoor de onderzoekswereld zich gesteld ziet; de maatschappelijke behoefte aan een optimale kwaliteit van leven (zowel materieel als fysiek) zonder dat daarvoor belastende dierproeven nodig zijn.
- *'Only do what we need to know and if you do, try to understand'* : ontwikkelingen en trends die vooral betrekking hebben op het eerste deel van deze kernzin zijn de aandacht voor de experimentele opzet en de kritische evaluatie van bestaande diermodellen. Dominant in de analyse zijn de ontwikkelingen en trends die gericht zijn op het verkrijgen van informatie over achterliggende mechanismen in (patho)fysiologische processen. Daarbij kan gedacht worden aan het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren maar ook aan het toenemend gebruik van vervangingalternatieven als weefselkweek (stamcellen, tissue engineering) en fysisch-chemische methoden.
- *'Don't modify, but change'* : onder deze categorie vallen de ontwikkelingen en trends die betrekking hebben op een fundamentele wijziging in onderzoeksstrategieën. Uitgangspunt is veelal dat de klassieke onderzoeksstrategie beperkingen kent en/of de vervanging van individuele testen door 3V alternatieven een lange en moeizame weg is. Een radicale verandering van teststrategie zou zowel een effectieve manier zijn om de relevantie van het onderzoek te vergroten als een aantrekkelijke route om proefdiervrije methoden te implementeren. Voorbeelden van deze categorie

zijn de consistency benadering in het vaccinonderzoek, de ITS in het toxiciteitsonderzoek of de risico beoordeling van stoffen.

- *'Want more, but accept less'* : deze kernzin is gerelateerd aan de toenemende diversificatie en beschikbaarheid van stoffen, geneesmiddelen en vaccins en aan de trend als maatschappij minder geneigd te zijn negatieve effecten en bijwerkingen van deze producten te aanvaarden. In dit verband kan gedacht worden aan de REACH wetgeving of aan de problematiek van hormoon versturende stoffen of ggo's en aan de neiging meer testen aan aan het testprogramma toe te voegen.
- *'Get more knowledge involved'*: een verwijzing hierbij vindt plaats naar het toenemende multi-disciplinaire karakter in het onderzoek, door het gebruik van innovatieve technologieën als genomics, system biology en dergelijke. Een andere verwijzing kan die zijn naar de trend met betrekking tot translationeel onderzoek.

Hoewel niet gebaseerd op wetenschappelijke trends zou voor het schetsen van een toekomstbeeld ook een andere zinsnede belangrijk zijn: *'get more, but pay less'*, waarmee de trend bedoeld wordt om, zowel in geld als tijd, op een meer economische manier onderzoek te doen, zonder dit ten koste te laten gaan van de kwaliteit van het onderzoek.

### 9.2 Ontwikkelingen en trends: beïnvloedende factoren

Hoewel in de voorgaande hoofdstukken een groot aantal wetenschappelijke ontwikkelingen en trends zijn benoemd valt moeilijk met zekerheid aan te geven waar deze zullen staan in 2020. Diverse factoren kunnen invloed uitoefenen op het verloop van een trend en op de snelheid waarmee deze zich ontwikkeld. De belangrijkste factoren zullen worden benoemd.

- *Onderzoeksbudgetten*. In het bijzonder met betrekking tot de ontwikkeling van 3V alternatieven. In principe bestaat het woord 'onmogelijk' niet in het wetenschappelijk onderzoek. Vooropgesteld dat er geen ethische overwegingen zijn om iets niet te doen, is praktisch elke vraagstelling oplosbaar. De beperkende factor is veelal het geld dat met het onderzoek gemoeid is. Niet zonder reden wordt een andere –omics als breekijzer voor een succesvolle 3V ontwikkeling gezien: ECONomics. Voor complexe vraagstellingen zal dit omvangrijk zijn, zowel in geld als in benodigde tijd;
- *Conflicterende belangen*. De noodzaak om 3V alternatieven te ontwikkelen wordt breed erkend en zal de komende jaren zeker verder gestalte krijgen. Echter, er zijn ook ontwikkelingen die het gebruik van proefdieren zullen doen toenemen zoals de wens tot absoluut veilige producten en de noodzaak tot onderzoek met betrekking tot life-style gerelateerde ziekten.
- *De internationale context*. Ontwikkelingen en trends in Nederland en zeker het tempo waarin deze plaats vinden kunnen niet los worden gezien van wat er elders in Europa en de rest van de wereld gebeurt. Zo is de forse investering in het onderzoek naar 3V alternatieven binnen het toxicologisch onderzoek niet vanuit Nederland vorm gegeven maar is het resultaat van het Europese beleid om alle chemische stoffen aan een risico-evaluatie te onderwerpen (REACH).
- *De regelgeving*. Circa 22% van het proefdiergebruik vindt plaats voor regulatoire doeleinden, waarbij de regelgeving tussen de continenten kan verschillen. Het ontbreken van harmonisatie tussen bestaande regelgeving vermindert de stimulans voor bedrijven om te investeren in de ontwikkeling van nieuwe methoden. Ook zal de implementatie van nieuwe 3V methoden of strategieën achterwege blijven als acceptatie van deze methoden/strategieën

nog niet heeft plaatsgevonden door de autoriteiten. Harmonisatie of eventueel wederzijdse erkenning van regelgeving is een politiek proces dat gestuurd wordt door diverse belangen. De praktijk heeft laten zien dat vooruitgang op dit terrein zeer moeizaam verloopt.

Omdat beïnvloedende factoren een verschillend gewicht kunnen leggen op de ontwikkelingen van individuele trends zal een uitspraak over het totaal effect van trends een grote bandbreedte in onzekerheid hebben. Wel echter kan uit de benoemde trends een algemene lijn gehaald worden. Deze lijn wordt zichtbaar door op meta-niveau naar algemene ontwikkelingen in het onderzoek te kijken. In de volgende paragraaf zal deze lijn worden toegelicht.

### **Conclusie**

In de komende jaren zal het gebruik van proefdieren in het onderzoek worden gestuurd door een grote diversiteit aan ontwikkelingen en trends die tegengestelde effecten kunnen sorteren: van een toename in het proefdiergebruik tot een afname, van een vermindering van het ongerief tot een toename van dit ongerief. Het lijkt om die reden moeilijk om vanuit individuele ontwikkelingen en trends te voorspellen wat de situatie in 2020 zal zijn. Mogelijk meer houvast kan een beoordeling van het onderzoek op meta-niveau geven.

Hoewel onderzoek en wetenschap voortdurend inspeelt op actuele ontwikkelingen in onderzoek, maatschappij en beleid, kan het ook als een autonoom orgaan worden gezien die voortdurend evolueert en die onderzoekmodellen en onderzoekstrategieën selecteert die beter dan de bestaande modellen en strategieën voldoen aan de gestelde eisen. Wat zijn die eisen? Allereerst geldt dat de methoden en strategieën relevant zijn in de zin dat ze een valide antwoord kunnen geven op de gestelde wetenschappelijke vraag, bij voorkeur zodanig dat het mechanisme dat aan het antwoord ten grondslag ligt begrepen wordt. Daarnaast dienen de methoden reproduceerbaar te zijn, moreel verdedigbaar en praktisch en economisch in uitvoerbaarheid. Geconstateerd moet worden dat diermodellen ten aanzien van de meeste van deze eisen beperkingen kennen. Dierexperimenteel onderzoek is duur, moeilijk reproduceerbaar, moreel problematisch en vaak zodanig complex dat achterliggende mechanismen moeilijk te benoemen zijn<sup>275</sup>. Het diermodel als gouden standaard in fundamenteel, toegepast en wettelijk verplicht, inclusief het wettelijk verplicht onderzoek, lijkt een achterhaald principe.

Dierexperimenteel onderzoek heeft in vergelijking met andere modellen in het onderzoek een voorsprong. Dierproeven doen we al sinds eeuwen. Daardoor is een grote diversiteit aan modellen beschikbaar, evenals data en specifieke reagentia en, niet in het minst, heeft het doen van dierproeven een traditie opgebouwd in het onderzoek. Vervangingsmodellen en strategieën kennen een veel kortere geschiedenis en traditie en zijn derhalve minder vanzelfsprekend. Daarnaast kennen veel van deze modellen nog wetenschappelijke beperkingen. Echter ontwikkelingen gaan door en vervangingsmodellen worden complexer. Beperkingen die gelden voor dierproeven zullen minder gelden voor vervangingsalternatieven. Veel vervangingsalternatieven produceren mechanistische informatie, hebben een gotere voorspellende waarde voor de mens, zijn ethisch minder discutabel en zijn kosten effectiever. Een veranderende rol van de dierproef laat zich al zien: meer en meer

---

<sup>275</sup> Coleman RA. (2009). Drug discovery and development tomorrow – changing the mindset. ATLA, Suppl.1: 1-4.

dient de dierproef ter confirmatie van wat met in vitro methoden is gevonden. De tijd komt, al zal dit niet vòòr 2020 zijn, dat vervangingsalternatieven in staat zullen zijn in te spelen op de vraag naar meer veiligheid en meer kennis over ziekten. Dat zal het moment zijn dat het doen van dierproeven eerder de uitzondering dan de regel zal zijn in het onderzoek. Verloopt dit proces min of meer autonoom, de snelheid waarmee doet dat niet. Beleid en financiering zijn in dat opzicht twee cruciale factoren die het proces kunnen remmen of versnellen.

## Bijlagen

### Bijlage 1:Lijst geïnterviewden en deelnemers workshop

#### Lijst geïnterviewden

Dr.Peter Bertens (NEFARMA)  
Dr. Andre Bianchi (CVI)  
Prof. Bas Blaauboer (UU-IRAS))  
Dr.Ronald Bontrop (BPRC)  
Dr. Timo Breit (Bioinformatica en genomics VU)  
Mw. Dr.Maurine Diets (RUG)  
Dr. Marieke Elferink (RUG)  
Prof.dr. Ron Fouchier (Virologie-EUR)  
Dr. Wilbert Frieling (Notox)  
Mw. Rita From (VWA)  
Dr. Bernward Garthof (Bayer CropScience AG)  
Prof dr. Groeneveld (VU-cardiovasculair instituut)  
Prof. Dr. Geny Groothuis (RUG)  
Prof.dr.Peter Heidt (BPRC)  
Dr. Martien Kas (UU-RMI)  
Dr. Gideon Kersten (NVI)  
Prof. dr. Jos Kleinjans (Unimaas)  
Dr. Herman Koeter (OrangeOHouse Partnership)  
Prof.dr. Jaap Koolhaas (RUG)  
Dr. Johan te Koppele (TNO Kwaliteit van Leven)  
Drs.Paul Kroon (ASG Lelystad)  
Prof. Herman Meurs (RUG)  
Prof. dr. Christine Mummery (LUMC)  
Dr. John Mulders (Schering-Plough Organon)  
Prof. Sjaak Neefjes (NKI)  
Dr. Hub Nooteborn (VWA)  
Dr. Theo Ockhuizen (Nutricom Consultancy)  
Prof dr.Frauke Ohl (UU-DWM)  
Prof. dr. Mark Post (CARIM Unimaas/ Tu Eindhoven)  
Dr. Jan-Bas Prins (LUMC)  
Prof.dr. Merel Ritskes-Hoitinga (Radboud Universiteit)  
Prof. Vera Rogiers (Vrije Universiteit Brussel (VUB)  
Dr. Martin Scholten (ASG WUR, Imares )  
Dhr.Henk Sloetjes (Biotechnische Vereniging)  
Drs.Henk Smid (ZonMw)  
Dr. Jan Willem Van der Laan (RIVM/EMEA)  
Prof.dr. Lex Van der Eb (LUMC, Crucell)  
Dr. Louk Vanderschuren (UU-RMI)  
Dr. Beppy Van de Waart (Notox)  
Dr. Hans Van Hattum (farma research animal health)  
Prof.dr. Harry van Steeg (RIVM, LUMC)  
Prof.dr. Bert Van Zutphen (emeritus Hoogleraar UU)  
Dr. Pieter Verbost (Schering-Plough Organon)  
Prof.dr. Jos Verheijden (Fac. Diergeneeskunde UU)  
Dr. Gerrit Jan Wennink (Schering-Plough Organon)  
Prof. dr. Ruud Woutersen (TNO en WUR)

**Deelnemers workshop**

Prof. Dr. Bas Blaauboer (UU)  
Dr. Pieter Verbost (Schering-Plough Organon)  
Drs. Janne Kuil (Nederlandse Vereniging tot Bescherming van Dieren)  
Dr. Philippe Vanparys (CARDAM)  
Dr. Marlies Leenaars (Radboud University Nijmegen)  
Dr. Ruurd Stolp (Adviseur Schering Plough Intervet)  
Dr. Roland Dobbelaer (Biologische Standaardisatie, SIPH, Brussel)  
Dr. Cyrille Krul (TNO, Hogeschool Utrecht)  
Dr. Martien Kas (Rudolf Magnus Institute)  
Prof dr. Ron Fouchier (Erasmus MC)  
Dr. Conchita Callant Cransveld (SenterNovem, ASATinitiative)  
Dr. Annemieke de Vries (RIVM)  
Dr. Lex Nagelkerken (TNO Kwaliteit van Leven, Leiden)  
Cornelis Brekelmans (EPAA,)  
Dr. Herman Koeter (Orange House Partnership)  
Dr. Leon van Aerts (EMEA and RIVM)  
Drs. Floor Frederiks (KNAW)  
Drs. Marlous Arenthous (Maatschappelijke Trendanalyse VU)  
Drs. Laura Hartman (Maatschappelijke Trendanalyse VU)  
Prof dr. Tjard de Cock-Buning (Maatschappelijke Trendanalyse VU)  
Marjolein van Boxel, Bsc (NCA, UU)

## Bijlage 2: Monitoringscriteria

In de Kabinetsvisie Alternatieven voor dierproeven wordt door het Kabinet de intentie uitgesproken het beleid naar 3V alternatieven te versterken en concretiseren. In samenhang daarmee wordt ook de noodzaak benoemd om naar buiten toe helderheid en uitleg te verschaffen over de complexe materie van dierproeven en alternatieven voor dierproeven, nu en in de toekomst ([www.minvws.nl/kamerstukken/vgp/2008/kabinetsvisie-alternatieven-voor-dierproeven.asp](http://www.minvws.nl/kamerstukken/vgp/2008/kabinetsvisie-alternatieven-voor-dierproeven.asp))

Dit streven kan alleen vorm krijgen als de overheid geïnformeerd blijft over ontwikkelingen, zowel op het gebied van dierproeven en alternatieven voor dierproeven. Een en ander onderschrijft de noodzaak om een instrumentarium van criteria op te zetten voor de monitoring van ontwikkelingen en trends. Deze criteria kunnen in een vroegtijdig stadium voor toepassingsgebieden een toenemend proefdiergebruik signaleren, verschuivingen aan het licht brengen over ongerief in het onderzoek of effecten van specifieke 3V toepassingen in kaart brengen. Voor de overheid biedt dit de mogelijkheid in een vroeg stadium via sturend beleid te anticiperen op komende ontwikkelingen of te interveniëren in lopende ontwikkelingen.

Een systeem voor monitoring zal uit twee elementen moeten bestaan: criteria voor het monitoren van ontwikkelingen op het gebied van proefdiergebruik en criteria voor het monitoren van 3V ontwikkelingen.

### *a. criteria voor het monitoren van ontwikkelingen op het gebied van proefdiergebruik*

In Nederland worden sinds 1978 gegevens over het proefdiergebruik geregistreerd en jaarlijks gepubliceerd in de rapporten 'Zo doende'. Aldus is een unieke en publieke database gecreëerd die retrospectief inzicht geeft over ontwikkelingen op het gebied van proefdiergebruik. Objectieve criteria als aantallen dieren, ongerief, aantallen vergunninghouders of toepassing van pijnbestrijding kunnen hieruit worden afgeleid. Opvallend genoeg worden de gegevens tot op heden nauwelijks gebruikt voor monitoringsdoeleinden. Sinds enkele jaren is voor een beperkt aantal criteria op de website van het NCA een overzicht in de tijd aanwezig. Voorgesteld wordt het aantal parameters uit te breiden. Te denken valt aan de volgende aspecten: 1) totaal aantal dieren, 2) diersoorten, 3) doeleinden proefdiergebruik, 4) specificatie doeleinden proefdiergebruik onderzoek wetenschappelijke vraag, 5) ongerief, 6) toepassing pijnbestrijding, 7) specificatie vergunninghoudende instellingen, 8) gebruik transgene dieren, 9) wettelijk verplicht onderzoek, e.a.

Jaarlijkse fluctuaties in gegevens zullen optreden. Niet noodzakelijkerwijs hoeven deze fluctuaties gerelateerd te zijn aan trends. Een benadering die voor de analyse van de gegevens in de tijd zou kunnen worden gebruikt is de (Shewart) control chart (zie box bijlage 8.1). Door middel van deze systemen is mogelijk het belang van ontwikkelingen te toetsen en trends in de ontwikkelingen te identificeren en afwijkingen een signaleringsfunctie te laten hebben. Dit biedt de mogelijkheid om in een vroeg stadium actie te ondernemen, dit volledig in lijn met het kabinetsbeleid Alternatieven voor dierproeven.

De Shewart control chart wordt onder andere gebruikt binnen de farmaceutische industrie om trends in productie en controle testen op te sporen. In een control chart worden gemiddelden berekend van metingen in de tijd. Elke nieuwe mening draagt bij aan en heeft invloed op het gemiddelde. Daarnaast worden de nieuwe waarden ook gebruikt om de standaard deviatie (SD) van het berekende gemiddelde te bepalen. Indien een nieuwe waarde buiten het  $\pm 2 \times \text{SD}$  gebied van het gemiddelde komt is dit een reden om het proces of de testmethode nader te analyseren op mogelijke problemen.

Monitoring van gegevens over proefdiergebruik uit Zo doende kunnen ook aangevuld door een monitoring van de rapportages die door de Europese Commissie worden uitgebracht of de jaarrapportages van de Home Office in Groot Brittannië. Dit vergroot de internationale context van de gevonden trends en ontwikkelingen.

*b. criteria voor het monitoren van ontwikkelingen op het gebied van alternatieven voor dierproeven*

Monitoringscriteria voor ontwikkeling en trends op het gebied van 3V alternatieven voor dierproeven zijn moeilijker te benoemen. Er bestaat geen jaarlijkse inventarisatie zoals voor het proefdiergebruik met de rapporten 'Zo doende', ook hebben de gegevens vaak een kwalitatief karakter. Pogingen in het verleden van de Veterinaire Hoofd Inspectie (Nadien de Voedsel en Warenautoriteit) om vergunninghoudende instellingen bij de jaarlijkse inventarisatie van het proefdiergebruik ook te bevragen over de implementatie van nieuwe 3V methoden zijn vastgelopen vanwege inconsistenties in de gerapporteerde gegevens. Indirect kunnen wel aanwijzingen worden gegenereerd uit de Zo doende rapporten. Zo kan een verlaging van het percentages experimenten met ernstig ongerief er op wijzen dat pijnbestrijding efficiënter wordt toegepast of experimenten met ernstig ongerief vervangen zijn door minder ongerief vergende experimenten, bijvoorbeeld door de implementatie van humane eindpunten. Hoewel niet optimaal heeft een inventarisatie toch waarde. Voorgesteld zou kunnen worden de rapportage in samenhang met de registratie voor Zo doende weer in te voeren en de gegevens voor zover het de 3V alternatieven betreft te laten bewerken door het NKCA. Dit biedt de mogelijkheid om de ontwikkelingen (geanonimiseerd) op te nemen in de data-base 3V methoden.

Monitoring van ontwikkelingen en trends in 3V alternatieven heeft weinig waarde als daarbij de internationale context uit het oog wordt verloren. Sites die daarvoor geraadpleegd kunnen worden zijn die van ECVAM (data-base voor informatie over gevalideerde en te valideren methoden), NC3R, ZEBET, EPAA en/of AltWeb. Voor informatie over nieuw 3V onderzoek kunnen de data-bases worden geraadpleegd van grote 3V onderzoek financierende instanties zoals DG Research (de Framework programma's), ZonMw, de Doerenkamp-Zbinden Foundation, e.a.

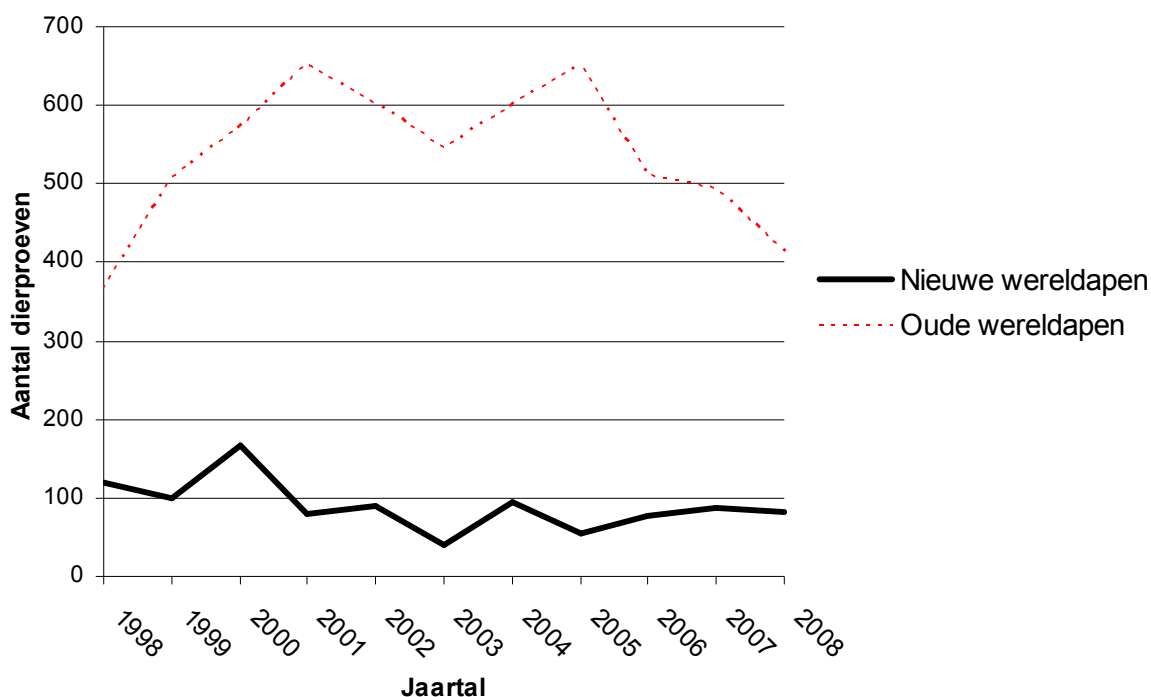
### Bijlage 3: Primaten

Hoewel niet wettelijk vastgelegd, nemen primaten binnen het onderzoek een bijzondere positie in. Deze positie heeft zowel een maatschappelijke als een wetenschappelijke basis. Om die reden zal in deze bijlage specifieke aandacht worden gegeven aan ontwikkelingen in het gebruik.

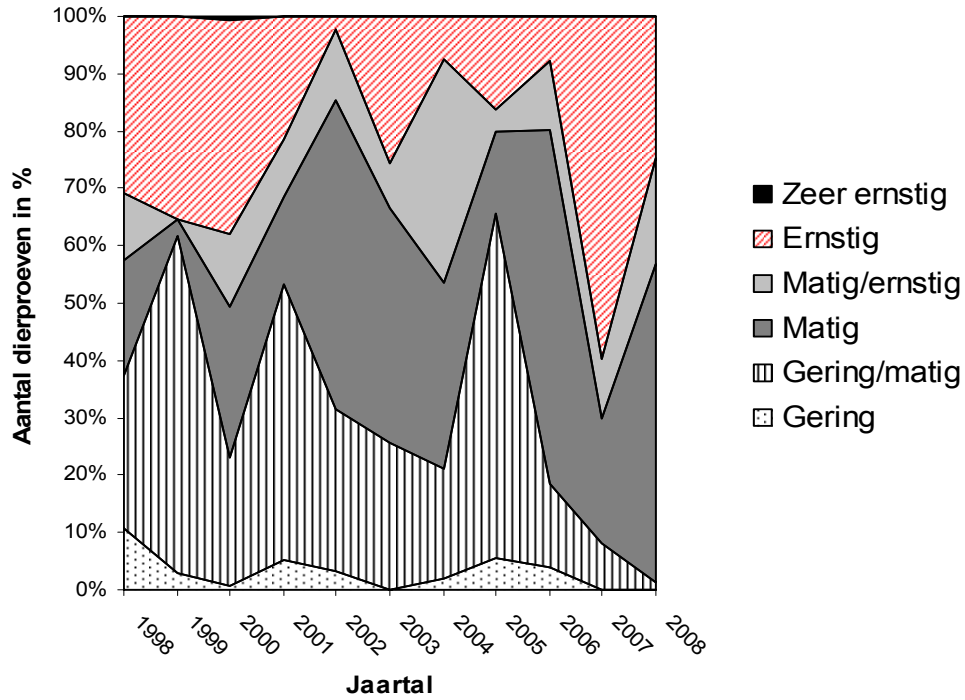
#### *Primaten: feiten en cijfers*

Binnen het onderzoek worden zowel oude wereld als nieuwe wereld apen gebruikt. Bij de Oude wereld apen gaat het voornamelijk om de rhesus aap (*Macaca mulatta*) en de java-aap (*Macaca fascicularis*). Bij de Nieuwe wereldapen gaat het vooral om de marmoset en de cotton tamarin. Daarnaast worden incidenteel half-apen of prosimians gebruikt. Sinds 2002 is in Nederland het gebruik van mensapen in het onderzoek wettelijk verboden. De verwachting is dat bij de wijziging van de Europese wetgeving op het gebied van dierproeven (Council Directive 86/609/EEC) dit verbod ook in Europa van kracht zal worden, maar mogelijk blijft een osnappingsclausule aanwezig. De betekenis van het verbod zal vooral een symbolische zijn. Nu reeds worden er in de landen van de EU geen mensapen meer gebruikt voor onderzoeksdoeleinden.

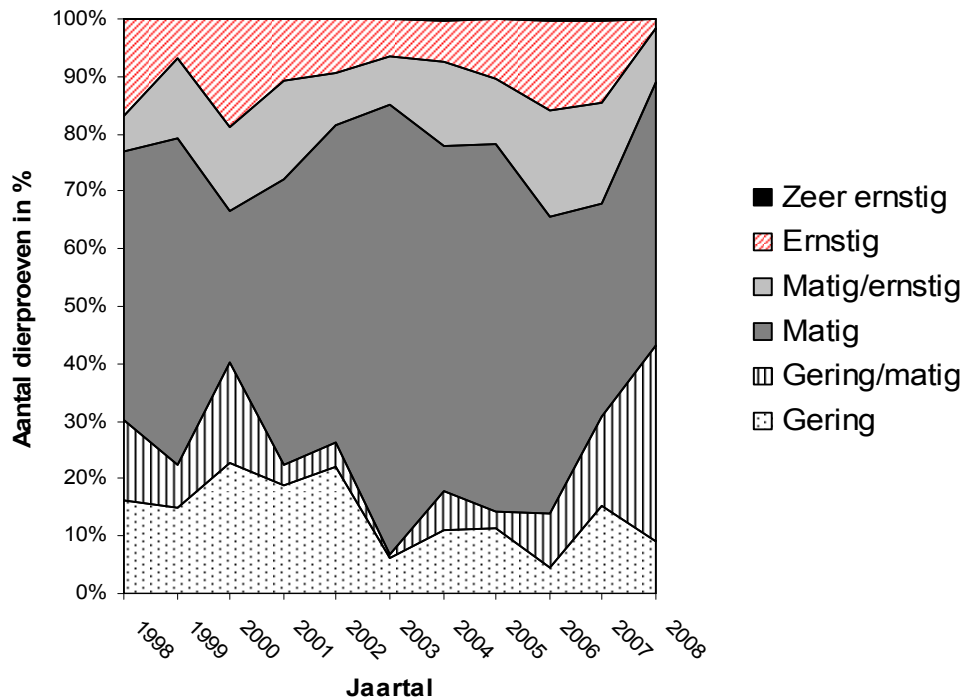
Feiten over het gebruik van primaten worden in de figuren 1 tot 3 weergegeven.



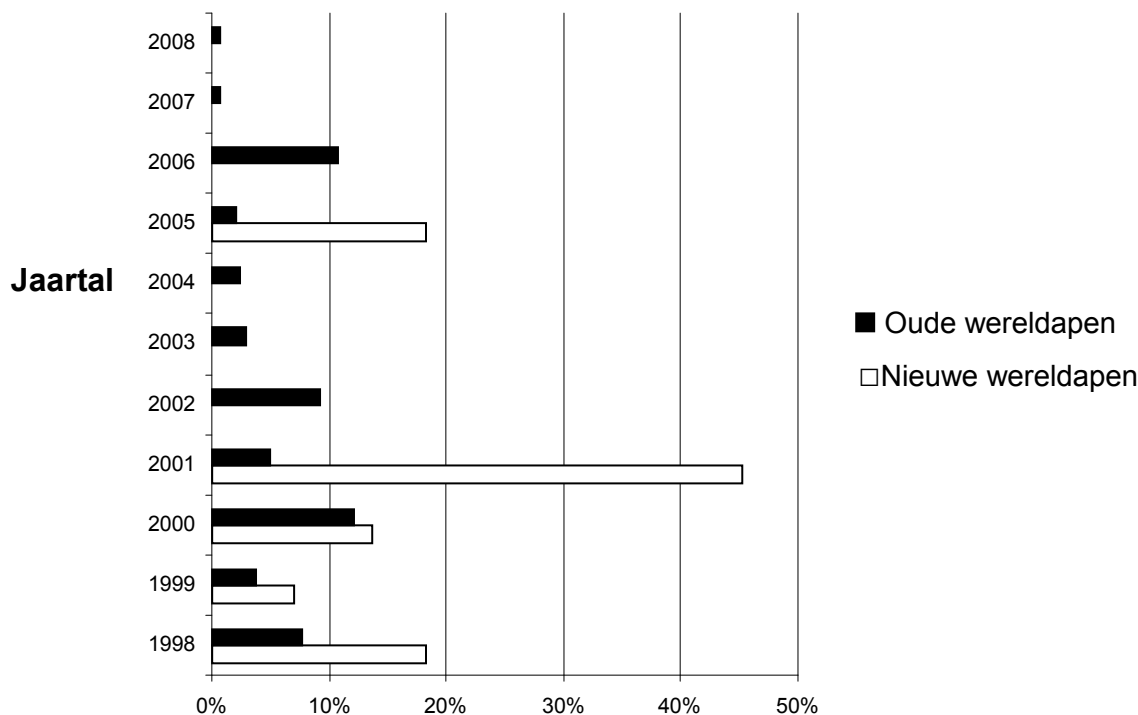
Figuur 1 bijlage 3: Aantal dierproeven uitgevoerd met oude en nieuwe wereldapen in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: 1998 tot 2008).



Figuur 2 bijlage 3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd met nieuwe wereldapen (in % van het totaal aantal dierproeven uitgevoerd met deze diersoorten) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998 tot 2008).



Figuur 3 bijlage 3: Mate van ongerief bij dierproeven uitgevoerd met oude wereldapen (in % van het totaal aantal dierproeven met deze diersoorten) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998 tot 2008)



### Aantal dierproeven voor wettelijke doeleinden als % van totaal

Figuur 4 bijlage 3: Aantal dierproeven uitgevoerd met oude en nieuwe wereldapen in het kader van wettelijke bepalingen (in % van het totaal aantal dierproeven uitgevoerd met oude en nieuwe wereldapen) in Nederland van 1998 tot 2008 (Bron: Zo doende 1998-2008).

Onderzoek met primaten vindt plaats voor een groot aantal onderzoeksdoelen waarvan de belangrijkste zijn:

- Infectieziekten zoals HIV, influenza, SARS, tuberculose, malaria;
- Neurodegeneratieve aandoeningen als Parkinson, MS, maar ook voor fundamentele neurobiologische doeleinden.;
- Chronische ziekten en autoimmuunziekten als artritis, ALS. Bij dit laatste neem ook het belang toe van de rol van virus infecties in autoimmuunziekten.
- De ontwikkeling van de personal medicines. Ontwikkeling van medicijnen voor specifieke bevolkingsgroepen;
- Ethologisch onderzoek.
- Gen- en stamceltherapie
- Transplantatie onderzoek. Centrale vraag is: hoe induceer je immuuntolerantie zonder de negatieve bijwerkingen
- Preklinisch onderzoek; veiligheidsevaluatie nieuwe geneesmiddelen waaronder monoclonale antistoffen en neurovirulentie test voor de vrijgifte controle van levend verzwakt polio vaccin.

#### Trends in het gebruik van primaten

Hoewel er tussen de jaren flinke schommelingen optreden in het gebruik van primaten in Nederland, wordt uit figuur 2.1. duidelijk dat over de jaren heen het gebruik vrij stabiel is. In sommige landen, zoals de VS, wordt het gebruik de afgelopen jaren zelfs gekenmerkt door een toename. De oorzaken die hiervoor worden aangevoerd zijn:

- Primaten worden over het algemeen ingezet voor vraagstellingen die een complexe achtergrond hebben zoals aandoeningen van het immuunsysteem of van het centrale zenuwstelsel. Het belang van dit type onderzoek zal toenemen, onder andere vanwege de vergrijzing van de bevolking;

- Primaten worden vooral gebruikt in het eindstadium van het onderzoek waarbij toetsing in een complex organisme met een grote verwantschap aan de mens essentieel is. Dit geldt ook voor nieuwe vormen in de behandeling van ziekten zoals de toepassing van monoclonale antistoffen;
- Primaten zijn voor een aantal vraagstellingen het enige model dat beschikbaar is omdat diermodellen die veder van de mens afstaan problemen met immunocompetentie een rol gaanspelen;
- Primaten zijn, zeker de in gevangenschap gefokte dieren, bijzonder goed gekarakteriseerd (genetisch, micro-biologisch, gezondheid) en daardoor een uitermate aantrekkelijk model voor specifieke vragen.

Grote veranderingen hebben zich het laatste decennium voorgedaan in de huisvesting van primaten. Voorgeschreven kooimaten zijn aanzienlijk toegenomen en de gebruikelijke single of duo huisvesting is vaak vervangen door groepshuisvesting en de inrichting van de kooien is complexer geworden door het aanbieden van speelmogelijkheden. Consequentie hiervan is dat het vangen van de dieren moeilijk is geworden en dieren getraind moeten worden om vrijwillig biotechnische handelingen als bloedafname te ondergaan.

In het onderzoek met primaten in toenemende mate niet invasieve meetmethoden gebruikt, vooral beeldvormende technieken als NMRI, CT-Scan en PET. Daarnaast zijn ook real-time monitoringsystemen als telemetrie inmiddels gangbare technieken om fysiologische en pathofysiologische gegevens te verzamelen.

Er zijn weinig voorbeelden bekend waarbij de primate vervangen is door proefdierlijke methoden of door lagere diersoorten. Een voorbeeld is de apen neurovirulentie test bij de vrijgifte van het levende polio vaccin<sup>276</sup>. Nederland produceert dit vaccin overigens niet. Er bestaan 2 vervangingsalternatieven; de MAPREC test, een PCR methode, en een transgeen muizenmodel (ICR-PVRTg21). Beide modellen zijn inmiddels gevalideerd maar nog niet geaccepteerd door de WHO als vervangingsalternatief voor de primate. Gebruik van de vervangingsalternatieven blijft daardoor beperkt tot pre-screening van vaccinbatches. Indien negatief dient alsnog de neurovirulentie test te worden uitgevoerd. Dit is een beeld dat voor veel vervangingsalternatieven in het primatenonderzoek naar voren komt: *in vitro* methoden worden op grote schaal gebruikt, maar vooral als screeningsmethode. Mogelijkheden liggen wel op het terrein van een vervanging door lagere diersoorten zoals fretten (influenza onderzoek) of transgene muismodellen .

#### *Mening van geïnterviewden*

De laatste jaren zijn diverse publicaties en stukken verschenen waarin de relevantie van de primate als model voor de mens ter discussie is gesteld<sup>277, 278</sup>. De geïnterviewde deskundigen delen deze mening niet. Dit sluit aan bij conclusies die getrokken zijn door de Gezondheidsraad in een rapport uit 1999<sup>279</sup> een mening die bevestigd wordt door de EU Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCER)<sup>280</sup>. Om redenen zoals genoemd in de voorgaande paragraaf worden primaten onmisbaar geacht voor het onderzoek, niet alleen als het directe toepassing bij de mens betreft maar ook binnen het fundamentele onderzoek. Men ziet dan ook de komende jaren geen grote veranderingen optreden in het gebruik van apen de komende jaren. Wel vinden de deskundigen dat het ethische afwegingsproces aangescherpt zou moeten worden, zo mogelijk door het instellen van een dierexperimentencommissie voor primatenonderzoek. Verder zijn enkele

---

<sup>276</sup> Dorsam V, Schmeel A, Chumakov K, Fibi MR.(1998). Alternative for the neurovirulence test. ALTEX 15(5): 21

<sup>277</sup> DLMR <http://www.dlrm.org/cambridge.htm>

<sup>278</sup> Safer Medicines Campaign. [http://www.curedisease.net/reports/Perspectives/vol\\_5\\_1995/Atherosclerosis.html](http://www.curedisease.net/reports/Perspectives/vol_5_1995/Atherosclerosis.html)

<sup>279</sup> Raad voor Gezondheidsonderzoek (1999). <http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/Advies%2018%20Primaten.PDF>

<sup>280</sup> Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCER).(2009) <http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/index.htm>

deskundigen van mening dat voor het wettelijk verplichte (primaten) onderzoek nut en noodzaak nog eens goed zouden moeten worden nagegaan. Hoewel formeel gezien het gebruik van primaten voor veel pre-klinisch onderzoek van farmaca en biologische producten als zodanig niet wordt beschreven, kan de praktijk anders zijn.

In lijn met de revisie van de Europese Richtlijn 86/609/EEC verwachten de deskundigen dat in de toekomst alleen met in gevangenschap gefokte dieren gewerkt zal worden. Naast het welzijnsaspect komt dit ook tegemoet aan de wetenschappelijke behoefte om met goed gekarakteriseerde dieren te werken. Dit laatste aspect is ook de reden dan niet verwacht wordt dat veel primaten onderzoek naar landen met minder stringente regels zal verhuizen. Een andere reden die hieraan ten grondslag ligt is het feit dat primatenonderzoek in toenemende mate een multi-disciplinair karakter krijgt. Deze expertise is minder makkelijk te verplaatsen naar een locatie op grote afstand. Mocht export van primatenonderzoek al plaatsvinden dan zal dit vooral preklinisch onderzoek betreffen.

Verschillende deskundigen verwachten dat de komende jaren primaten-faciliteiten in Nederland gecentraliseerd gaan worden, mogelijk op één locatie. Voordelen liggen op het vlak van specialisatie, centralisatie van kostbare apparatuur, kennis en kunde op het gebied van gedrag, huisvesting en verzorging en het feit dat veel onderzoek al berust op samenwerkingsverbanden.

## Bijlage 4: Genomics onderzoek feiten en cijfers

Helaas zijn er geen exacte gegevens beken over hoeveel dierexperimenten er in Nederland en Europa exact in het kader van genomics onderzoek worden uitgevoerd. Om toch meer inzicht te krijgen in de omvang van genomics onderzoek in Nederland en Europa zal hier inzicht gegeven worden in de onderzoeksbudgettering van genomics onderzoek door het Netherlands Genomics Initiative (NGI) en door de EU.

### Onderzoeksbudgettering voor genomics onderzoek in Nederland

In 2002 en 2003 is 281 miljoen euro beschikbaar gesteld door de overheid voor genomics onderzoek via het NGI programma<sup>281</sup>. In 2008 is opnieuw geld beschikbaar gesteld voor het NGI programma 280 miljoen euro beschikbaar gesteld. Met behulp van deze overheidsbijdrage hoopt NGI geld te mobiliseren uit het bedrijfsleven en in het totaal 500 miljoen euro te kunnen investeren in genomics onderzoek. Van de beschikbaar gestelde 280 miljoen gaat 25 miljoen euro naar het Toxicogenomics centrum. Het Toxicogenomics centrum heeft naast het ontwikkelen van betere methodes voor veiligheidsonderzoek, het onderzoek naar alternatieven als speerpunt (NGI, 2008).

**Figuur 4.9a – Begroting NGI 2008-2012**

Budget NGI [EUR miljoen]		2008	2009	2010	2011	2012	TOTAAL
<b>ONDERZOEK</b>	Centre for Biosystems Genomics (CBSG)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	15,0
	Cancer Genomics Centre (CGC)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	22,5
	Kluyver Centre	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	15,0
	Forensic Genomics	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	6,0
	Nieuwe centra	1,5	2,5	2,5	3,0	3,0	12,5
	Afbouw Centre for Medical Systems Biology (CMSB)	2,0	1,5	1,0	0,5	-	5,0
	Netherlands Toxicogenomics Centre (NTC)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	25,0
<b>INFRA-STRUCTUUR</b>	Netherlands Proteomics Centre (NPC)	-	5,0	5,0	5,0	5,0	20,0
	Netherlands Bioinformatics Centre (NBIC)	-	-	2,5	5,0	5,0	12,5
	Netherlands Metabolomics Centre (NMC)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	25,0
	Systeembioologie	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	15,0
<b>TALENT</b>	Horizon Programma	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	20,0
<b>GENOMICS &amp; SAMENLEVING</b>	Centre for Society and Genomics (CSG)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	25,0
<b>NGI</b>	Valorisatie	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	32,5
	Internationale samenwerkingsprojecten	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	4,5
	Innovatieve Clusters	-	-	4,0	4,0	4,0	12,0
	Bureaunkosten	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	12,5
<b>TOTAAL</b>		<b>47,1</b>	<b>52,6</b>	<b>58,6</b>	<b>61,1</b>	<b>60,6</b>	<b>280,0</b>

### Onderzoeksbudgettering voor genomics onderzoek binnen de EU

Ook de Europese commissie besteedt veel geld aan genomics onderzoek. Dit wordt beschikbaar gesteld in “multiannual framework programmes” (Fps). Het Fp6 programma, wat liep van 2002 tot 2006, had een totaal budget van 20 miljard. Het meeste genomics dierexperimenteel onderzoek werd verricht in gezondheidsgerelateerde onderzoek wat een totaal budget besloeg van 2,5 miljard<sup>282,283</sup>. Daarnaast is er onderzoek naar alternatieven voor dierproeven gefinancierd door de EU waar genomics tools een belangrijke rol spelen.

<sup>281</sup> Van den Brink, E. and E. Thole (2008). *NGI 2002-2007 • MAKING THE MOST OF GENOMICS*, The Hague

<sup>282</sup> Desaintes, C., (2008) Research on animal model organisms funded by the European Commissions framework programmes. *Disease Models & Mechanisms*, 1(4-5): 209-212.

<sup>283</sup> European Commission (2008). *European Research for a Healthier Future*.

“Genomics en systemsbiology” is een van de focuspunten van het FP7 programma “Health”. Het FP7 “Health” programma loopt van 2007 -2013 en bedraagt een totaal van 6 miljard euro. Onder het focuspunt “Genomics and systemsbiology” vallen de volgende projecten:

- Apoptosis Systems Biology Applied to Cancer and AIDS (APO-SYS);
- The ‘Genetics of healthy ageing’ (GEHA),
- ‘European drug initiative for channels and transporters’ (EDICT),
- ‘European conditional mouse mutagenesis program’(EUCOMM: hiermee zullen 650 mutante muizen kunnen worden gecreëerd om ziekte modellen mee te maken.
- The HYPERGENES project gebruikt genomics tools om bij 4 000 menselijke genen te identificeren die van belang zijn voor een te hoge bloeddruk.

Genomics onderzoek komt ook voor in een van de andere speerpunten van het FP7 programma. In het focus punt “*medical research*” is het programma “*Osteoporosis: signalling pathways in bone formation and homeostasis, genetic factors of osteoporosis*” en voorbeeld van genomics gerelateerd onderzoek. Een voorbeeld binnen “*infectious diseases*” is het “*Genomic age: confronting the problem of drug resistance*” programma een indicatie dat op meerdere terreinen genomics onderzoek plaats vindt (EuropeanCommission, 2008) .

Zoals gezegd is het lastig om te achterhalen hoeveel geld er exact betrokken is bij de totale hoeveelheid dierexperimenteel onderzoek wat onder een genomics benadering valt. Meer inzicht is te krijgen in de onderzoekbudgettering voor onderzoek naar 3V alternatieven waar genomics onderzoek ook een grote rol in speelt. Voor 2010 is er een budget van 25 miljoen beschikbaar. Dit vormt ongeveer 4% van het totale “health” budget voor 2010 wat ongeveer 638 miljoen Euro beslaat. Binnen de meeste van deze projecten spelen bio informatica en ‘omics” een grote rol.

## **Bijlage 5: Wet en regelgeving en Relevante organisaties**

### *Inleiding*

De wet en regelgeving die van invloed is op het dierproefgebruik is complex en veelomvattend. Grofweg is een onderverdeling te maken in verticale en horizontale wetgeving. Verticale wetgeving is wetgeving die de activiteiten reguleert van een bepaalde sector) en onder horizontale wetgeving wordt verstaan wetgeving die voor alle sectoren geldt met betrekking tot dierexperimenten<sup>284</sup>. Zowel de verticale wetgeving die betrekking heeft op bepaalde sectoren zoals de ontwikkeling en productie van pesticiden, voedsel, chemische stoffen, cosmetica of medicijnen, als de horizontale wetgeving die over de hele breedte van het onderzoek dierexperimenten reguleert, is van invloed op het proefdiergebruik. In dit hoofdstuk zullen ontwikkelingen in kaart worden gebracht met betrekking tot de horizontale wetgeving en verticale wetgeving in relatie tot dierproeven. Daarnaast zullen de belangrijkste instanties worden benoemd die verantwoordelijk zijn voor beide vormen van wetgeving. Een diepte beschrijving van wet- en regelgeving is, gezien de beperkte projectduur, niet mogelijk. Dit overzicht is dan ook niet volledig. Doel is enig idee te geven over de belangrijkste ontwikkelingen.

### *Globale horizontale wetgeving*

Bij de globale horizontale wetgeving is de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO = OECD) de belangrijkste instantie die van invloed is op het proefdiergebruik. De OESO produceert internationaal geaccepteerde instrumenten, beslissingen en aanbevelingen die de regels bepalen met betrekking tot de vereisten aan producten. Deze regels zijn opgesteld voor de bevordering van globale handelseconomie. Een van de belangrijkste aanbevelingen van de OECD is de "Dessin of the Council concertino the Mutuele Acceptanten of Data in the assessment of Geniaal 1981 (aangepast in 1997). Deze beslissing bepaalt dat wanneer OESO lidstaten voldoen aan de principes van Good Laboratoria Practice (GLP) zij elkaar onderzoeksresultaten accepteren.

### *Horizontale wetgeving met betrekking tot dierproeven binnen de EU*

De Richtlijn van de Europese Raad van 24 november 1986<sup>285</sup> betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (86/609/EEC) is opgesteld om voor harmonisatie te zorgen tussen Lidstaten binnen de EU. In deze Richtlijn zijn randvoorwaarden opgesteld voor de huisvesting en verzorging van proefdieren. Daarnaast zijn er eisen aan personen die met de proefdieren werken zoals dierverzorgers en biotechnici, onderzoekers en proefdierdeskundigen, eisen aan fok en aan leverende bedrijven. Verder stelt de Richtlijn dat dierproeven niet zijn toegestaan wanneer op andere manieren de resultaten kunnen worden verkregen en moeten Lid-Staten onderzoek stimuleren naar 3V alternatieven.

Sinds de Richtlijn is vastgelegd, is de kennis met betrekking tot ethologie en fysiologie van dieren toegenomen en zijn nieuwe technologieën zoals genetische modificatie

---

<sup>284</sup> Schiffelers M-J., Hagelstein G., Harreman A., Van der Spek M., Regulatory Animal Testing: A Survey of the factors influencing the use of animal testing to meet regulatory requirements, *Science shop Utrecht University* 2005

<sup>285</sup> Europese Raad, RICHTLIJN VAN DE RAAD van 24 november 1986 inzake de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de Lid- Staten betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (86/609/EEG) (PB L 358 van 18.12.1986, blz. 1)

geïntroduceerd. Daarnaast is er een groeiende zorg vanuit de maatschappij met betrekking tot dierproeven. Richtlijn 86/609/EEC wordt daarom als verouderd beschouwd. Een aantal Lid-Staten heeft nationale wet -en regelgeving aangepast aan de nieuwe wetenschappelijke inzichten met betrekking tot dieren. Dit heeft tot een oneerlijke concurrentie positie voor Lidstaten geleid die hogere eisen stellen aan dierproeven. Bovenstaande heeft ten grondslag gelegen aan het voorstel tot herziening van richtlijn 86/606/EEC. Het voorstel voor een Richtlijn van het Europees parlement en de raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (2008/0211 (COD))<sup>286</sup> is 5 november 2008 gepubliceerd en bevat een aantal grote veranderingen.. Ondertussen zijn er diverse herzieningen geweest waarvan de laatste van 10 november 2009..Deze herzieningen kunnen nog veranderd worden en ook over de accodering van de uiteindelijke revisie bestaat op moment van schrijven nog onduidelijkheid. De wijzigingen die hieronder worden benoemd zijn dus onder voorbehoud.

Ten eerste zal iedere dierproef getoetst moet worden op wetenschappelijke validiteit en ethische toelaatbaarheid (nut van de proef). Hiervoor zullen per gebruikende, fok of leverende instelling permanente ethische toetsingscommissies\* worden verplicht gesteld bestaande uit tenminste een dierenarts, personen die verantwoordelijk zijn voor de verzorging en het welzijn van de dieren en bij instellingen die dierexperimenten verrichten een onderzoeker. De permanente ethische toetsingscommissie zal een adviserende rol hebben met betrekking tot dierwelzijn, inpassing van 3V alternatieven en zal projecten die minstens 12 maanden lopen, toetsen op aantallen dieren en ontwikkelingen met betrekking tot verfijning. Daarnaast moet ieder project van te voren getoetst worden door een bevoegde instantie met leden met verschillende expertises op het gebied van het desbetreffende wetenschappelijke doel, dierwelzijn, opzet van dierexperimenten, statistiek, veterinaire zorg, ethiek en 3V alternatieven. Hierbij moeten het ongerief voor het dier afgewogen worden tegen de mogelijke baten van de uitkomsten van het dierexperiment en wordt de wetenschappelijke kwaliteit getoetst. In Nederland gebeurt dit nu per experiment.

In het voorstel krijgen 3V alternatieven een veel centralere rol. Zo worden Lidstaten verplicht om onderzoek te verrichten dat bij kan dragen aan de vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven en moeten er uitwisselingsprogramma's worden opgezet voor organen en weefsels van dieren die op humane wijze voor deze weefsels zijn geëuthanaseerd. Dit laatste zal waarschijnlijk binnen Europa gezien worden als vervanging. Dit omdat binnen de Europese wetgeving in tegenstelling tot de Nederlandse wetgeving een dier dat alleen als bron voor weefsel wordt gebruikt, weliswaar definieert als een proefdier, maar de procedure niet geregistreerd wordt als dierexperiment. Voor de validatie van vervangingsalternatieven moeten de Lidstaten referentielaboratoria aanwijzen en zullen expertise centra worden opgezet met kennis over 3V alternatieven.

Ook zijn de regels voor het gebruik van primaten strenger geworden. Het gebruik van mensapen; chimpansees, bonobo's, gorilla's and orang-oetangs wordt verboden, evenals het gebruik van primaten die in het wild worden gevangen of die uit wildvang apen worden gefokt. Primaten mogen volgens het nieuwe voorstel alleen nog gebruikt worden voor fundamenteel onderzoek, voor onderzoek naar levensbedreigende ziekten, voor "disabling diseases" , voor onderzoek voor de instandhouding van de betreffende soort en voor onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van medicijnen, voeding en andere producten. Met disabling diseases bedoelt men ziekten die kunnen leiden tot een beperking in het functioneren van de mens. Lidstaten mogen wel op EU niveau een aanvraag indienen voor het gebruik van mensapen wanneer zij kunnen aantonen dat onderzoek naar "disabling

---

<sup>286</sup> Council of Europe (2008). 6<sup>th</sup> draft of the Proposal for a Directive of the European Parliament and the Council on the Protection of animals used for scientific purposes. 15546/08 – COM.

\* Deze commissie wordt in de laatste versie van 2008/0211 (COD) van 10 november 2009 animal welfare body genoemd

diseases”, levensbedreigende ziekten en voor onderzoek naar de instandhouding van de betreffende soort niet anders kan dan met behulp van experimenten met humane primaten (artikel 50.2).

Onder de nieuwe richtlijn zullen ook dieren vallen die volgens 86/606/EEG niet gedefinieerd zijn als een proefdier. Ten eerste zullen Cephalopoda (inktvisen) onder de bescherming van de wet komen te vallen. Ten tweede zullen zelfstandig voedende vertebraten in het larvale stadium en foetussen die verder zijn dan tweederde van hun embryonale ontwikkeling onder de richtlijn gaan vallen.

Met betrekking tot onderzoekers en verzorgers van proefdieren zullen strengere eisen worden gesteld aan opleiding en nascholing. Daarnaast zullen de regels rond huisvesting en verzorging aangepast worden aan nieuwe inzichten zoals deze zijn vastgelegd in de aanbeveling van de commissie van 18 juni 2007 betreffende richtsnoeren voor de huisvesting en verzorging van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (2007/526/EG)<sup>287</sup>. Tot slot beoogt het nieuwe voorstel transparantie door de bekendmaking van niet-technische informatie over projecten, nationale uitvoeringsregels en -richtsnoeren, rapportage over de toepassing en rapportage van statistische gegevens.

#### *Horizontale wetgeving in Nederland: Wet op de Dierproeven*

In Nederland omvat de Wet op de Dierproeven (Wod) de horizontale wetgeving met betrekking tot dierproeven. De Wod is gebaseerd op een vergunningsstelsel en een regeling voor toezicht op naleving van de wet. Uitgangspunt van het vergunningsstelsel is dat het verrichten van dierproeven uitsluitend is toegestaan indien de proeven zijn gericht op de belangen van mens en dier, namelijk gezondheid en voeding. Daarnaast is het stelsel gericht op het beperken van het aantal dierproeven en het aan proefdieren berokkende ongerief. Hiermee is de Wod dus altijd al gericht op de drie V's<sup>288</sup> en een afweging van nut voor de mens, maatschappij of dier versus ongerief voor het proefdier.

De 2008/0211 (COD) lijkt ook met betrekking tot andere aspecten meer op de Wod dan Richtlijn 86/609/EEG. Bijvoorbeeld is het in Nederland al sinds oktober 2003 verboden dierexperimenten uit te voeren op mensapen en is het al sinds 1997 ingevoerd dat dierproeven niet gebruikt mogen worden voor het testen van de veiligheid van bestaande cosmetica producten of voor de ontwikkeling van cosmetica.

Met name met betrekking tot de controle op dierproeven is de Wod anders dan 2008/0211 (COD). Zo vindt in Nederland ethische en wetenschappelijke toetsing per experiment plaats. Volgens de nieuwe Richtlijn moet er getoetst worden op project niveau. Daarnaast moeten projecten volgens de 2008/0211 (COD) door een nationaal bevoegde instantie worden beoordeeld. In Nederland gebeurt dit via een door de vergunninghouder zelf aangewezen Dier Experimentele Commissie (DEC). Deze DEC's zouden kunnen worden aangewezen als de bevoegde instanties.

#### *Verticale wetgeving*

Verschillende instellingen zijn betrokken bij de ontwikkeling van en de controle op de verticale wetgeving rond farmacologische producten, voeding en pesticiden, chemicaliën en cosmetica. In de volgende paragrafen zullen de belangrijkste instellingen die

---

<sup>287</sup> Aanbeveling van de Commissie van 18 juni 2007 betreffende richtsnoeren voor de huisvesting en verzorging van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt (*Kennisgeving geschied onder nummer C(2007) 2525*) (1)

<sup>288</sup> Schiffelers, M, Hagelstein, Harreman, A. VanderSpek, M. Regulatory Animal Testing: a survey of factors influencing the Use of Animal Testing to Meet Regulatory requirements

verantwoordelijk zijn voor de handhaving en ontwikkeling van verticale wetgeving worden behandeld.

### Geneesmiddelen en biologische producten

Op mondiaal niveau is de International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals (ICH) van belang. De ICH bestaat uit partners vanuit de industrie en beleidsvertegenwoordigers vanuit Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan), de EU (EMA) en de VS (US Food and Drug Administration). De ICH houdt zich bezig met het harmoniseren van de eisen voor het veiligheidsonderzoek op geneesmiddelen tussen verschillende landen. Dit is geen gemakkelijk proces. Nadat er een wetenschappelijke consensus is over een bepaalde test moeten de verschillende spelers van de ICH deze nog accepteren. Met name door de politieke en culturele verschillen tussen landen verloopt dit zeer moeizaam.<sup>4</sup>

Het Europees Geneesmiddelen Bureau (EMA) is een belangrijke regelgevende instantie op EU niveau. De EMA is verantwoordelijk voor de implementatie en handhaving van wet- en regelgeving en heeft de bevoegdheid om producten toe te laten op de Europese markt. Het Bureau bepaalt dus welk wetenschappelijk bewijs voor effectiviteit en veiligheid van farmaceutische producten geleverd moet worden en speelt hierdoor een grote rol bij de acceptatie van nieuwe procedures en technieken met betrekking tot dierproeven.

De EMA wordt ondersteund door een aantal wetenschappelijke comités en een aantal wetenschappelijke werkgroepen. De wetenschappelijke comités zorgen voor de beoordeling van farmacologische producten binnen hun deelgebied en leggen de beoordeling van kwaliteit, veiligheid en effectiviteit voor aan de Europese Commissie. Vervolgens kan de Europese Commissie een marktvergunning geven voor de Europese markt voor het desbetreffende product. Er zijn wetenschappelijke comités voor de deelgebieden humane en veterinaire geneesmiddelen (CHMP en CVMP), er is een speciaal comité voor geneesmiddelen voor de behandeling van zeer zeldzame ziekten ook wel Orphan Medicinal products (COMP) en sinds 2008 is de Paediatric Committee (PDCO) opgericht. De PDCO beoordeelt de zogenaamde "paediatric investigation plans" (PIPs) oftewel plannen voor onderzoek naar de geschiktheid van farmaceutische producten voor de behandeling van kinderen onder de 18 jaar. Vanaf 2009 zijn PIP's niet alleen vereiste voor nieuwe geneesmiddelen, maar ook voor geneesmiddelen die al op de markt zijn.

Naast de EMA is op Europees niveau de European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) van belang. De EDQM beheert de Europese Farmacopee. De Farmacopee is een verzameling van specificaties hoe geneesmiddelen, ingrediënten van geneesmiddelen, bloedproducten en vaccins onderzocht moeten worden en welke tests hiervoor gebruikt moeten worden. De Europese Farmacopee bepaalt dus welke kwaliteits- en veiligheidstests gedaan moeten worden voor het op de markt brengen van bestaande producten. De voorschriften van deze tests worden geformuleerd door een aantal wetenschappelijke comités binnen de EDQM. Er zijn regelmatig vernieuwingen aan de farmacopee op basis van nieuwe wetenschappelijk inzichten of bij het op de markt komen van nieuwe producten<sup>289</sup>. Soms betreffen deze wetenschappelijke inzichten de implementatie van 3V alternatieven die door instanties als EDQM of ECVAM gevalideerd zijn<sup>290</sup>.

---

<sup>289</sup> EDQM, [http://www.edqm.eu/en/Mission\\_Structure-53.html](http://www.edqm.eu/en/Mission_Structure-53.html); 25 november 2009

<sup>290</sup> EDQM, Alternatives to animal testing: New approaches in the development and control of biologicals, International Symposium organized by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe in close co-operation with the Ministry of Health and Social Welfare of Croatia of 23-24 April 2008, p 16-28

Met name voor de controle of ijking van sera, vaccins of andere biologische producten vormen een aandachtspunt in verband met dierproeven. Vanwege het complexe productieproces dat in geval van vaccins veelal uitgaan van levende ziektekiemen bestaat een grotere kans dat er tussen geproduceerde partijen verschillen optreden. De laatste jaren zijn een aantal tests met betrekking tot biologicals gevalideerd en opgenomen in de farmacopee. Voorbeelden hiervan zijn 3V modellen voor het werkzaamheidsonderzoek van differie- en tetanus vaccin, van het vlekziekte (varkens) vaccin en van het NewCastle disease (kippen) vaccin. Momenteel wordt gewerkt aan de implementatie vijf gevalideerde methoden voor *in vitro* pyrogeniteitstesten. Tot slot is in de Europese Farmacopee de mogelijkheid gegeven om de veiligheidstest in doeldieren (oftewel het dier waar het product voor bedoeld is, bij de routine kwaliteitscontrole van veterinaire vaccins geschrapt) weg te laten<sup>291</sup> ..

Op nationaal niveau is het CBG verantwoordelijk voor de beoordeling en bewaking van de werkzaamheid, risico's en kwaliteit van geneesmiddelen en biologische producten voor mens en dier. Ook beoordeelt het CBG de veiligheid van Novel Foods op veiligheid. Het CBG werkt samen met verschillende universiteiten en instellingen als het RIVM. Het CBG behoort tot een netwerk aan instellingen die zorgen voor de beoordeling en registratie van geneesmiddelen en diergeneesmiddelen binnen Europa. Dit netwerk wordt gecoördineerd door de EMEA. Het CBG kan invloed uitoefenen op de richtlijnen voor de beoordeling van geneesmiddelen.

#### Farmaceutische en biologische producten: ontwikkelingen met betrekking tot regelgeving

Een trend die mogelijk van invloed kan zijn op het aantal dierproeven is de ontwikkeling van geneesmiddelen die voor maar een beperkte groep patiënten van toepassing is. Er komen steeds specifiekere medicijnen op de markt en er is sinds 2002 een speciale procedure voor deze zo genaamde weesgeneesmiddelen. Het is nog onzeker hoe autoriteiten op dit soort specifieke medicijnen zullen reageren. Gerelateerd hieraan is de Best Pharmaceuticals for Children Act (2007) hierin wordt gesteld dat niet alleen veiligheid en werkzaamheid van geneesmiddelen in volwassenen moet worden aangetoond, maar ook in kinderen. Deze act heeft mogelijk ook invloed op het preklinische onderzoek. Zo heeft ICH een draft richtlijn ontwikkeld om juveniele toxicologie aan te tonen. Binnen deze richtlijn is wel enige ruimte wat betreft het extrapoleren vanuit gegevens van volwassenen naar kinderen. Maar wanneer er bepaalde onzekerheden zijn dan worden dierproeven ingezet.<sup>292</sup>

Daarnaast is het onbekend hoe de regelgeving zal reageren op medicijnen die door middel van nieuwe technieken zijn gemaakt. Bijvoorbeeld door nanotechnologie zouden er meer veiligheidstests vereist kunnen worden. Dit wordt niet alleen veroorzaakt door de autoriteiten. Ook bedrijven hebben de neiging om bij nieuwe ontwikkelingen uitgebreider te testen dan misschien wetenschappelijk noodzakelijk is. Dit komt omdat zij streven naar een snelst mogelijke goedkeuringsprocedure. Zeer grondig testen op veiligheid kan er toe bijdragen dat stoffen eerder worden goedgekeurd. Wanneer een soortgelijke stof vervolgens op de markt komt, vereisen de autoriteiten de uitgebreide test procedure die zij eerder onder ogen hebben gekregen. Meer overleg in een vroegtijdig stadium tussen beleid, bedrijven en wetenschap zou dit kunnen verhelpen. Volgens de respondenten kan overleg tussen wetenschappelijke comités van bijvoorbeeld de EMEA in een vroegtijdig stadium van een ontwikkelingsproces kan het doen van niet relevante veiligheidstests mogelijk voorkomen

---

<sup>291</sup> VWA, Zo doende, 2008

<sup>292</sup> Note for guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (cpmp/ich/286/95)

Een stap die als veelbelovend wordt gezien, is het openstellen van dossiers over mislukte farmaceutische en biologische stoffen. Zo kan voorkomen worden dat stoffen opnieuw onnodig getest worden. Geld, tijd en geheimhouding zijn mogelijke barrières voor de industrie om studies met mislukte stoffen te publiceren.

### Voeding

Op mondiaal niveau is de Commission Codex Alimentarius verantwoordelijk voor de harmonisatie met betrekking tot voedselveiligheid. De commissie houdt zich bezig met de inhoud van de Codex Alimentarius. In de codex staat precies omschreven hoe getest moet worden om te bewijzen dat voedselproducten voldoen aan normen met betrekking tot hygiëne, additieven, resten van pesticiden en veterinaire producten, contaminatie, labelling en presentatie<sup>293</sup>. De Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) is een onafhankelijk commissie die de Commission Codex Alimentarius adviseert met betrekking tot voedsel additieven, de controle van voeding op contaminatie, natuurlijke toxinen en mogelijke resten van veterinaire geneesmiddelen. JECFA ontwikkelt de richtlijnen voor veiligheidstests van voeding. Daarnaast is zij verantwoordelijk geweest voor het testen van meer dan 1500 voedingsadditieven op veiligheid. De Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) is op mondiaal niveau verantwoordelijk voor de richtlijnen voor het testen van de veiligheid van pesticiden. Tot slot is er nog een commissie die de Codex adviseert met betrekking tot contaminatie van voedingsproducten door micro-organismen: de Joint FAO/WHO Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA)<sup>294</sup>. De code is niet bindend voor producenten en landen. Echter de World Trade Organization (WTO) erkent de codex als een standaard voor voedselveiligheid en hierdoor krijgt de codex wel een bindend karakter<sup>295296</sup>. Binnen de Commissie Codex Alimentarius bestaat geen specifiek beleid betreffende dierproeven.

Een belangrijke instelling die de veiligheid van voedingsmiddelen op EU niveau reguleert is de European Food Safety Authority. Deze is verantwoordelijk voor de veiligheid van de gehele voedselketen dus ook pesticiden. De EFSA bestaat uit elf wetenschappelijke panels die ieder een ander aspect van de voedselveiligheid van voeding controleren of gespecialiseerd zijn op specifieke producten. Zo bestaat er een panel voor 'voedselcontactmateriaal, enzymen, aroma's en technische hulpstoffen (CEF), een panel voor voedseladditieven en nutriënten toegevoegd aan voeding ' voor gewasbeschermingsmiddelen en de residuen daarvan (PPR), een panel genetisch gemodificeerde organismen (GMO), en een panel diergezondheid en welzijn (AHAW).

In Nederland is de VWA verantwoordelijk voor de controle op de kwaliteit en veiligheid van voedingsproducten, pesticiden (die later nog aan de orde zullen komen) en andere goederen in Nederland. Daartoe brengt de VWA risico's in beeld, beoordeelt ze, communiceert erover en maakt ze beheersbaar in de samenleving. Tevens verzorgt de organisatie de uitwisseling van informatie en documentatie tussen EFSA en Nederland en faciliteert wederzijdse ondersteuning. De autoriteit is opdrachtgever voor onderzoek wat onder andere ten grondslag ligt aan het opstellen van richtlijnen met betrekking tot veiligheidsonderzoek (VWA, 2009).

---

<sup>293</sup> Codex Alimentarius Commission, Codex Alimentarius procedural manual eighteenth edition, 2008

<sup>294</sup> Codex Alimentarius Commission, [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_en.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp), 25 november 2009

<sup>295</sup> WTO, [www.wto.org/english/thewto\\_e/coher\\_e/wto\\_codex\\_e.htm](http://www.wto.org/english/thewto_e/coher_e/wto_codex_e.htm), 25 november 2008

<sup>296</sup> Guy, A. and Griffin, G. Adopting alternatives for the regulatory monitoring of shellfish for paralytic shellfish poisoning in Canada: Interface between federal regulators, science and ethics, Regulatory and Pharmacology Toxicology and Volume 54, Issue 3, August 2009, Pages 256-263

### Voeding: ontwikkelingen met betrekking tot regelgeving

Eén van de meest recente ontwikkelingen met betrekking tot voeding op EU niveau en uiteindelijk ook op nationaal niveau is de wetgeving met betrekking tot voedingsinformatie en het maken van claims.. Sinds januari 2007 zijn de EU-regels aangepast met betrekking tot gezondheidsclaims<sup>□</sup> op het etiket van voedingsproducten. Hierin wordt gesteld dat gezondheidsclaims die niet algemeen geaccepteerd zijn, bewezen moeten worden in klinische studies in de mens(1924/2006/EG).<sup>297</sup> Daarbij geldt dat een gezondheidsclaim moet zijn bewezen in de doelgroep waar het product voor bedoeld is (bijvoorbeeld ouderen kinderen of zwangere vrouwen) en moet het werkzaam zijn in de vorm waarin mensen het consumeren (bijvoorbeeld een margarine). De regels gelden voor gezondheidsclaims op eten, drinken en voedingssupplementen, zoals vitaminepillen. Tot nu toe was per Lidstaat geregeld welke gezondheidsclaims waren toegestaan en hoeveel bewijs er aan de claims ten grondslag moest liggen.

Aan de aanvragen die zijn ingediend liggen *in vivo*, *in vitro* studies en studies in mensen ten grondslag<sup>298</sup>. Er zijn vooralsnog weinig aanvragen goedgekeurd. Het is onbekend wat de effecten zijn van de nieuwe wetgeving op het proefdiergebruik. In onze enquêtes geven een aantal respondenten aan dat zij verwachten dat er meer dierproeven als gevolg van de strengere wetgeving zullen worden verricht. Er zijn er echter ook mechanismen denkbaar die zouden kunnen zorgen voor een vermindering van het gebruik van dierproeven. Sommigen vermoeden dat de nieuwe wetgeving met betrekking tot voedingsclaims zo ontmoedigend gaat werken dat industrieën minder gaan investeren in onderzoek naar gezondheidsbevorderende werking van voedingsmiddelen en/of ingrediënten. Voornamelijk het midden en kleinbedrijf zal de klinische trials die nodig zijn, niet kunnen betalen. Daarnaast zullen bedrijven hun producten zo snel mogelijk in klinische trials gaan testen. Vooral wanneer het niet om “novel food” producten gaat, “history of safe use “ is, hoeven producten niet eerst getest te worden op veiligheid en kan snel in de mens getest worden .

Een andere recente ontwikkeling die van invloed kan zijn op het aantal dierproeven in verband met verplichte regulatoire tests voor voeding is de discussie rond genetisch gemodificeerde planten. Gezien de grote maatschappelijke aandacht voor GMO zijn de veiligheidseisen groot. Mogelijk zal het aantal dierexperimenten binnen dit gebied dan ook groeien.

Een trend die invloed heeft ook op het testen van overige stoffen waaronder chemicaliën voor gewasbescherming, additieven e.d. is dat op het gebied van de geneesmiddelen is er een toenemende trend voor proefdieronderzoek met jonge/juveniele proefdieren. Dit type onderzoek kan een beter inzicht verschaffen in toxische effecten van stoffen (bijwerkingen) bij kinderen, die niet kunnen worden afgeleid uit onderzoek met volwassen proefdieren (CDER 2006). Hierbij is het uitgangspunt dat zich ontwikkelende organen het hoogste risico lopen. Dus wanneer er mogelijk sprake is van postnatale ontwikkelingstoxiciteit, zou dit bij voorkeur moeten worden onderzocht met juveniele proefdieren of met een aangepaste onderzoeksopzet, bijvoorbeeld een aanpassing van het reproductietoxiciteitsonderzoek zodat dieren met een vergelijkbare ontwikkelingsstatus worden meegenomen. Vergeleken met bestaande, klassieke teststrategieën, gebruikt deze aanpak minder proefdieren.

Tot slot is men bezig met het opstellen van richtlijnen voor het vaststellen van producten die nanoparticles bevatten. Of dit zal leiden tot andere testen is vooralsnog niet bekend<sup>299</sup>.

---

<sup>□</sup> beweringen over de relatie tussen het eten of drinken van een product en het effect daarvan op de gezondheid

<sup>297</sup> VERORDENING (EG) Nr. 1924/2006 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 20 december 2006 inzake voedings- en gezondheidsclaims voor levensmiddelen

<sup>298</sup> [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178621456747.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178621456747.htm)

<sup>299</sup> Bouwmeester H., Dekkers, S. Noordam M., Hagens, W., Bulder A., de Heer, C, ten Voorde, S. Wijnhoven, S., Sips, A., Health impact of nanotechnologies in food production, Report 2007.014

Blootstelling aan nanodeeltjes kan blootstelling aan een hele reeks afmetingen een vormen van deeltjes inhouden. De bestaande aanpak voor risicobeoordelingen van stoffen is daarom niet zondermeer hanteerbaar. Vooral is nader onderzoek nodig om na te gaan of nanodeeltjes vergeleken met conventionele chemische stoffen nadelige gezondheidseffcten hebben en of de klassieke testen inclusief dierproeven met chemische stoffen hier zeggingskracht hebben. In ieder geval zal een formele risicobeoordeling voor bewust geproduceerde nanomaterialen van geval tot geval moeten worden uitgevoerd (VWA-BuR 2008, Covin, 2003)<sup>300301</sup>

Richtlijnen met betrekking tot de veiligheid van voeding zijn niet voor alle aspecten van voedselveiligheid aanwezig. Resultaten van proefdieronderzoeken worden gebruikt om een NOAEL (no observed adverse effect levels) en ADI (geaccepteerde dagelijkse inname), TDI (Tolerable Daily Intake) of ARfD (Acute Referentie Dosis) te onderbouwen. Er zijn (generieke) handleidingen voor het bepalen van ADI van additieven en bestrijdingsmiddelen, maar niet voor contaminanten. Ten aanzien van de milieucontaminanten zijn er geen specifieke vereisten. Veelal zijn de aanbevolen testmethoden vastgelegd in OECD Testrichtlijnen (TG), die internationaal zijn geaccepteerd door de regulerende autoriteiten.

Vooralsnog zal de voedselveiligheid niet zonder dierexperimenten gegarandeerd kunnen worden. Maar het kan wel efficiënter en met minder proefdieren door het implementeren van onderzoeksstrategieën (zie ook hoofdstuk 5 en 7) waarbij meer gebruikt wordt gemaakt van klinische gegevens. Door het gebruik van klinische gegevens komt de nadruk te liggen op potentieel schadelijke effecten die voor de mens van belang zijn en vermindert de onzekerheid die het gevolg is van het verschil tussen proefdieren en mensen. Zo zou bijvoorbeeld de beschikbare klinische informatie die voortkomt uit gezondheidsonderzoek bij de mens kunnen worden gekoppeld aan gegevens van blootstelling aan stoffen zoals geneesmiddelen, milieucontaminanten e.d. Bij de acceptatiefase van 3V alternatieven door autoriteiten kunnen problemen ontstaan door bijvoorbeeld het ontbreken van interesse van regelgevende autoriteiten en het vaak ontbreken van specifieke reagentia en referentiepreparaten. Daarnaast laat IRAS onderzoek (Ans Punt) zien dat huidige onderzoeksactiviteiten vooral gericht zijn op alternatieve methoden en technieken die bijdragen aan vooral 'hazard assessment', terwijl er juist meer modelonderzoek nodig is naar het verkrijgen van kwantitatieve informatie uit alternatieve strategieën die gebruikt kan worden als input in een risicobeoordeling. Ten slotte verdient het de aanbeveling om naast de validatie van 3V alternatieven een systematische analyse uit te voeren naar de validiteit van gebruikte diertesten in het tetrichtlijn onderzoek van chemische stoffen, geneesmiddelen en biologische producten.

### Chemicaliën

Op mondiaal niveau is de international program on chemicals safety (IPCS), een samenwerkingsverband tussen de Wereld Gezondheidsorganisatie, de International Labour Organization and the United Nations Environmental Programme (UNEP), een belangrijke organisatie in verband met het beleid rond chemicaliën.<sup>302</sup> Deze organisatie werkt nauw samen met de OECD.

Op Europees niveau is ECHA verantwoordelijk voor onderzoek naar mogelijk schadelijke chemicaliën en voor de registratie, evaluatie autorisatie en mogelijk verbod op chemische substanties. Andere belangrijke instanties ten aanzien van het beleid rond chemicaliën op EU niveau zijn de Scientific Committee on Health and Environmental Risk (SCHER) en

---

<sup>300</sup> Advies Bureau Risicobeoordeling (nanodeeltjes in voedsel (1 februari 2008) <http://www.vwa.nl>

<sup>301</sup> Colvin V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials, *Nature Biotechnol* (2003)21: 1166-1170

<sup>302</sup> [http://www.who.int/ipcs/about\\_ipcs/en/index.html](http://www.who.int/ipcs/about_ipcs/en/index.html), toegang op 1 december 2009

Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), SCHER is verantwoordelijk voor het advies met betrekking tot risico's voor gezondheid en milieu veroorzaakt door chemicaliën, biochemicaliën en biologische producten. Het gaat bijvoorbeeld om de effecten van biociden, afval en plastic op drinkwater en lucht. SCCP kijkt naar chemicaliën die gebruikt worden in consumenten goederen. Zoals verf, kleding, speelgoed en cosmetica. In de US is de U.S Environmental Protection Agency (EPA) van belang en in Japan de National Institute of Technology and Evaluation.

In Nederland is de Voedsel en Waren Autoriteit en het RIVM verantwoordelijk voor de controle op chemicaliën en het College ter beoordeling van Pesticiden verantwoordelijk voor de controle van nieuwe pesticiden die op de markt komen.

### Chemicaliën: ontwikkelingen met betrekking regelgeving

Zowel in de horizontale wetgeving rond chemicaliën, dus wetgeving die van toepassing is op alle chemicaliën, als in de verticale wetgeving rond chemicaliën zijn er veranderingen gaande die van invloed zijn op het proefdiergebruik.<sup>303</sup>

Veranderingen horizontale wetgeving:

- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances (REACH) vastgelegd in Regulation (EC) No 1907/2006
- Horizontale wetgeving met betrekking tot endocrine disruptors
- Horizontale wetgeving met betrekking tot mixture toxicity
- Horizontale wetgeving met betrekking tot nanomateriaal (zie paragraaf voeding en wetgeving)
- Regulation for Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures (CLP Regulation, January 2009) vastgelegd in Regulation (EC) No 1272/2008 in navolging van de Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)

### REACH

De tot voor kort 40 geldende wetgevingen met betrekking tot de productie, im- en export en verkoop van chemische stoffen worden vervangen door een enkel systeem: Europese Verordening (nr. 1907/2006) inzake REACH. Dit wordt door de geïnterviewden gezien als een ontwikkeling die van grote invloed zal zijn op het proefdiergebruik in het toxicologisch onderzoek. De aanvullende tests die worden vereist zullen een stijging kunnen betekenen op het proefdiergebruik. Tegelijk kan het een sterk stimulerende werking hebben op het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven ( RIVM; zie website NCA). Om duplicatie van testen te voorkomen, zal elk nieuw onderzoeksplan voor diertesten gedurende 45 dagen open staan voor ideeën van belanghebbende partijen. Toxicologische gegevens voor de mens zal voor zover mogelijk moeten worden verkregen via andere methoden dan dierproeven, zoals bijvoorbeeld op *in vitro* alternatieven. Zulke alternatieve onderzoeksmodellen moeten worden gevalideerd door de Europese Commissie of internationale instituten. Ook zal de Commissie elke drie jaar een rapport uitbrengen over het gebruik van alternatieve testmethoden en zonodig voorstellen doen met betrekking tot de wetgeving (zie ook hoofdstuk 3).

### Endocriene Verstoorers

Endocriene verstoorers zijn stoffen die de functie van hormonen of hormoon regulerende organen verstoren in het lichaam. Endocriene verstoorers kunnen bijvoorbeeld invloed

---

<sup>303</sup> <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/>, toegang op 1 december 2009

hebben op de fertiliteit, de kans op kanker verhogen of de ontwikkeling van het centraal zenuwstelsel verstoren. Sinds 1999 is de EU bezig met het opstellen van strengere regels voor het testen van stoffen op endocriene versturende effecten.

Probleem met betrekking tot stoffen met endocrien versturende effecten is, dat nog niet goed gedefinieerd is hoe deze effecten gemeten moeten worden. Test guidelines worden nog door de OECD in samenwerking met de EU ontwikkeld voor mogelijke endocrien versturende effecten van stoffen<sup>304</sup>. Er zijn onder andere in vivo tests met vissen<sup>305</sup> en ratten<sup>306307</sup> gevalideerd.

### Ontwikkelingen Verticale regelgeving rond pesticiden

Pesticiden zijn producten die planten beschermen tegen schadelijke organismen. Volgens de Europese wetgeving vallen pesticiden uiteen in twee typen producten: gewasbeschermingsproducten en biociden. Gewasbeschermingsproducten zijn pesticiden die gebruikt worden in de landbouw. Biociden zijn pesticiden die niet in de landbouw gebruikt worden.

De EU heeft een nieuwe richtlijn en twee verordeningen ontwikkeld met betrekking tot pesticiden waarvan Verordening (EG) nr. 1107/2009 sinds 21 oktober 2009 van kracht is:

- Richtlijn van het Europees parlement en de raad tot vaststelling van een kader voor communautaire actie ter verwezenlijking van een duurzaam gebruik van pesticiden (pending)
- Verordening (EG) nr. 1107/2009 van het Europees Parlement en de Raad van 21 oktober 2009 inzake het op de markt brengen van gewasbeschermingsmiddelen
- Voorstel voor een verordening van het Europees Parlement en de Raad betreffende het op de markt brengen en het gebruik van biociden (pending)<sup>308309</sup>

De Verordening (EG) nr. 1107/2009 vervangt Council Directive 91/414/EEC. In Council Directive 91/414/EEC werd met behulp van een risico assessment beoordeeld of een pesticide op de markt mocht worden toegestaan of mocht blijven. In de nieuwe Verordening worden stoffen beoordeeld door middel van een aantal cut off criteria waaraan de stoffen moeten voldoen<sup>310</sup>. Wanneer blijkt dat een stof niet voldoet aan een bepaald aspect dan zal deze niet verder worden geëvalueerd. Een stof wordt niet verder geëvalueerd wanneer is aangetoond dat de stof:

- Mutageniteit I en II is Mutageniteit I zijn stoffen die bekend staan als mutageen. Mutageniteit II zijn stoffen waarbij de bewijsvoering het aannemelijk maakt dat ze mutageen zijn.<sup>311</sup>;
- Carcinogeen of toxisch voor de voortplanting is;
- Het eigenschappen heeft die het endocriene systeem verstoren;
- twee van de volgende eigenschappen heeft:

---

<sup>304</sup> COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT on the implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372), SEC(2007) 1635

<sup>305</sup> Katciadaki, I, The 21-day androgenised female stickleback endocrine screening assay, <http://www.oecd.org/dataoecd/17/31/43327146.pdf>, toegang op 1 december 2009

<sup>306</sup> OECD, Preliminary draft updated test guideline 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents; updated with Parameters for endocrine effects, 2006

<sup>307</sup> OECD, Guidance Document For Histologic Evaluation Of Endocrine And Reproductive Tests In Rodents, ENV/JM/MONO(2009)11

<sup>308</sup> <http://www.montesquieu-institute.eu>

<sup>309</sup> <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/index.htm>

<sup>310</sup> Karabelas, A.J., Plakas, K.V., Solomou, E.S., Drossou, V., Sarigiannis, D.A., Impact of European legislation on marketed pesticides-A view from the standpoint of health impact assessment studies, *Environment International* 35, (2009) 1096-1107

<sup>311</sup> Parry, J.M. Reflections on the implications of thresholds of mutagenic activity for the labelling of chemicals by the European Union, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (2000) 464 (1), 155-158

- Persistent organic pollutants (dit zijn stoffen die moeilijk of langzaam worden afgebroken in het milieu)
- Persistent bioaccumulating and toxic (dit zijn toxische stoffen die niet worden afgebroken in het lichaam, zich ophopen en daardoor het lichaam langdurig blootstellen aan toxische effecten)
- Very persistent and very bioaccumulating (dit zijn stoffen die zeer moeilijk afbreken en zich in grote mate ophopen in het lichaam).<sup>312</sup>
- de acceptabele dagelijkse inname en het blootstellingsniveau lager zijn dan van bestaande producten\*

Naar alle waarschijnlijkheid zullen verschillende van de reeds goedgekeurde gewasbeschermers volgens de nieuwe wetgeving worden afgekeurd (WTO 2008; Kemi 2009; Psd 2008<sup>11313314</sup>). Daarnaast zijn de data sets die reeds bestaan nog niet compleet en moeten er mogelijk nieuwe veiligheidstests gedaan worden en nieuwe veiligheidstests voor ontwikkeld worden<sup>9</sup>. Mogelijk zijn hier dierproeven bij betrokken. De nieuwe wetgeving zou dus mogelijk tot een verhoging van het aantal dierproeven kunnen leiden.

Qua test richtlijnen heeft de Technical Committee van Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA), een commissie van ILSI Health and Environmental Sciences Institute (HESI), een voorstel gemaakt voor een verbeterde aanpak om de veiligheid van chemicaliën voor gewasbescherming te bepalen. De ACSA Life Stages Task Force stelt een getrapte aanpak voor om nadelige effecten van een stof te testen op voortplanting en die de aard en ernst van effecten tijdens ontwikkeling en volwassenheid, met aandacht voor de gevoeligheid van ouderen. De voorgestelde aanpak gaat uit van de bestaande richtlijnen en omvat een nieuw reproductie- en ontwikkelingsonderzoek bij de rat met verbeterde eindpunten en een ontwikkelingsonderzoek bij het konijn (Cooper et al. 2006). Vergeleken met bestaande, klassieke teststrategieën, gebruikt deze aanpak minder proefdieren, verschaft informatie over effecten in het jonge dier en bevat een schatting van de humane blootstelling

### Cosmetica

Cosmetica zijn volgens de wet stoffen of preparaten die verschillende delen van het menselijk lichaamsoppervlak reinigen, wijzigen, beschermen en/of verfraaien<sup>315</sup>. Cosmetica producten behoren tot de consumentenproducten. Cosmetische producten moeten getest worden op acute toxiciteit, huid en oog irritatie, huid sensibilisatie, toxiciteit bij herhaaldelijke toediening, mutageniteit, reproductie toxiciteit, carcinogeniteit, absorptie in de huid, toxicokinetische eigenschappen, fototoxiciteit en op de huid van humane vrijwilligers<sup>316</sup>

Toezicht op de naleving van de veiligheidseisen van consumenten producten valt onder de verantwoordelijkheid van de Voedsel en Warenautoriteit. Hoewel in Nederland in de Wod al in 1997 is opgenomen dat cosmetica niet mag worden getest in proefdieren, wordt de cosmetica wetgeving toch gezien als van belang voor trends met betrekking tot dierproeven. De Cosmetica richtlijn<sup>317</sup> stelt namelijk dat binnen de EU, cosmetica niet meer getest mag

---

<sup>312</sup> Kemi, <http://www.kemi.se/templates/PRIEngFrames.aspx?id=4144&gotopage=4148>, toegang op 1 december 2009

\* Met acceptabele dagelijkse inname wordt bedoelt: acceptable daily intake, acute reference dose, acceptable operator exposure level

<sup>313</sup> Kemi, Interpretation in Sweden of the impact of the "cut-of" criteria adopted in the common position of the council concerning the regulation of placing plant protection products on the market (document 11119/08), Sweden 2008

<sup>314</sup> Pesticides Safety Directorate (PSD), Revised assessment of the impact on crop protection in the UK of the 'cut-of criteria' and substitution provisions in the proposed regulation of the European Parliament and of the council concerning the placing of plant protection products on the market. York, UK 2008

<sup>315</sup> <http://www.vwa.nl/>

<sup>316</sup> Council Directive 73/404/EEC of 22 November 1973 on the approximation of laws of the Member States relating to cosmetics products. OJ L262, 69-200, 27 September 1976

<sup>317</sup> Dir. 2003/15/EC of the European Parliament and of the council of 26 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of laws of the Member States relating to cosmetic products. OJ. L066, 26-35, 11 maart 2003

worden met behulp van dierproeven. Hierdoor zijn cosmetica bedrijven behoorlijk gaan investeren in de ontwikkeling van vervangende tests.

De richtlijn bestaat uit een verbod op het testen van cosmetica in proefdieren (testing ban) en een verbod op het in de handel brengen van cosmetica die getest zijn op proefdieren (marketing ban). De testing ban is ingegaan op 11 maart 2009 en de marketing ban gaat in op 11 maart 2013. De testing ban houdt in dat er vanaf 2004 geen volledig cosmetisch product mag worden getest op dieren en geen enkel ingrediënt van het cosmetisch product wanneer vervangingstests zijn ontwikkeld en gevalideerd.

De marketing ban stelt dat er vanaf 2009 in de lidstaten van de EU ook geen producten mogen worden verkocht die buiten de Europese Unie getest zijn op dieren waarvoor een alternatieve methode bestaat met uitzondering van toxiciteit bij herhaaldelijke toediening, reproductiestoxicologie en toxicokinetiek. Na 2013 mogen producten die getest zijn op toxiciteit bij herhaaldelijke toediening, reproductietoxicologie en toxicokinetische eigenschappen ook niet meer verkocht worden.

Tot nu toe zijn gevalideerd en opgenomen in de wetgeving: huid irritatie, fototoxiciteit, huid absorptie, genotoxiciteit/mutageniteit, en embryotoxiciteit.<sup>318</sup> Voor acute toxiciteit, huid sensibilisatie zijn verminderings- en verfijningsalternatieven ontwikkeld.<sup>319</sup>

De cosmetica wetgeving zal in Europa geen grote vermindering in het aantal dierproeven met zich mee brengen. In Europa wordt 0.1 % van het totaal aantal dierproeven verricht in verband met het testen van cosmetica. Maar zoals gezegd heeft de nieuwe wetgeving wel geleid tot druk bij de industrie om vervangingsalternatieven te ontwikkelen. Uiteindelijk is er dus een indirect effect op het aantal dierproeven. Door sommige respondenten wordt dit als een goede strategie beschouwd om de ontwikkeling van 3V alternatieven te versnellen, critici zijn echter van mening dat wanneer de wetgeving harder gaat dan de wetenschappelijke mogelijkheden er fouten gemaakt kunnen worden die vervangingsalternatieven in een kwaad daglicht kunnen zetten.

---

<sup>318</sup> European Commission, Report from the commission to the council and the European parliament Report on the Development, Validation and Legal Acceptance of Alternative Methods to Animal Tests in the Field of Cosmetics (2007) [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/cosmetics/documents/animal-testing/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/cosmetics/documents/animal-testing/index_en.htm)

<sup>319</sup> Pauwels, M., Rogiers, V. EU legislations affecting safety data availability of cosmetic ingredients, Regulatory Toxicology and Pharmacology 49 (2007) 308-315

## **Bijlage 6: Samenstelling begeleidingscommissie en andere betrokkenen**

- Ir. Rob Buré is afgevaardigde van NWO/ ZonMW. Hij is gemandateerd vergunninghouder voor dierproeven aan Wageningen Universiteit en Researchcentrum (WUR) en heeft inzicht in trends m.b.t. dierproeven ten behoeve van de landbouw en voeding. Hij is van oorsprong etholoog en heeft jaren welzijnsonderzoek verricht bij varkens
- Dr. Pieter Verbost is afgevaardigde van de Centrale Commissie Dierproeven (CCD). Hij is werkzaam bij NV Organon (Schering Plough) als proefdierdeskundige en researcher van de Womens Health Department.
- Dr. Jan Willem van der Laan is afgevaardigde namens het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) waarvoor hij deskundige dierproeven en geneesmiddelen is. Hij werkt als seniorbeoordelaar farmacologie en toxicologie van geneesmiddelen bij het RIVM.
- Prof. dr. Bas Blaauboer is afgevaardigde van de programmeringscommissie van ZonMW. Hij werkt bij het Instituut voor Risk Assessment Sciences (IRAS) en heeft als specialisatie in vitro toxicologie. Sinds vorig jaar is hij hoogleraar Vervanging voor Proefdieren bij Toxicologische Risicobeoordeling aan de Universiteit Utrecht (UU).
- Ing. Tineke Coenen, Msc is afgevaardigde van de Nederlandse Vereniging van Dierexperimentele Commissies (NVDEC). Na haar carrière als onderzoeker en hoofd proefdierfaciliteit bij NV Organon werkt zij als zelfstandig proefdierdeskundige en adviseur op proefdierkundig gebied voor o.a. universiteiten, CRO's en industrie.
- Drs. Janne Kuil is afgevaardigde van de Dierenbescherming. Zij werkt als senior beleidsmedewerker bij de Dierenbescherming op het gebied van dierproeven en biotechnologie.
- Dr. Peter Bertens is afgevaardigde van de Nederlandse Vereniging van de Research georiënteerde Farmaceutische Industrie (Nefarma). Hij heeft bij Nefarma onder meer innovatie, biotechnologie en dierproeven in zijn portefeuille.
- Prof. dr. Hoeijmakers is afgevaardigde van de Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (KNAW). Hij is hoogleraar Moleculaire Genetica en hoofd van de Afdeling Genetica aan het Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam.
- Drs. Dirk van Well is afgevaardigde van de Vereniging van de Nederlandse Chemische Industrie (VNCI). Hij is werkzaam bij de VNCI als senior beleidsadviseur voor chemische stoffen.

### Uitvoerders

- Prof. dr. Coenraad Hendriksen is projectleider van de wetenschappelijke trendanalyse. Hij is 35 hoogleraar Alternatieven voor Dierproeven en hoofd van het NCA aan de UU. Daarnaast werkt hij bij het Nederlands Vaccin Instituut (NVI) als proefdierdeskundige en als onderzoeker met bijzondere aandacht voor alternatieven voor dierproeven.
- Ir. Rixt Komduur is aangesteld als project medewerkster voor de wetenschappelijke trendanalyse en treedt op secretaris van de commissie. Zij heeft biologie gestudeerd en zit in de afrondingsfase van een promotie onderzoek naar de maatschappelijke aspecten van nutrigenomics bij WUR.

### Acknowledgements:

- Hester Stekelenburg heeft stage gelopen bij het NCA. Zij studeert Lifesciences aan de Hogeschool Utrecht en heeft een literatuuronderzoek uitgevoerd naar 3V alternatieven voor dierproeven.
- Anne van de Riet heeft stage gelopen bij het NCA. Zij studeert . aan de HAS en heeft geholpen met de enquêtes.
- Joris Smaling heeft een scriptie geschreven in opdracht van het NCA in het kader van zijn Msc Biomedische wetenschappen aan de Universiteit van Amsterdam
- Dr. Jan van der Valk (NKCA) heeft geholpen met het stuk over proefdieren in het onderwij

## Bijlage 7: Onderzoeksvragen

Hoofdonderzoeksvraag 1:

- Wat zijn de belangrijkste huidige en toekomstige wetenschappelijke ontwikkelingen in relatie tot dierproeven die op termijn invloed kunnen hebben op de inzet van proefdieren, dierproeven en alternatieven voor dierproeven en/of op het nationale en (Europese) internationale beleid rondom dierproeven, proefdieren en alternatieven voor dierproeven?

Naar aanleiding van de hoofdonderzoeksvraag 1 zijn een aantal subvragen geformuleerd die onder te verdelen zijn in een overkoepelende vraag, trends m.b.t. het proefdier, trends m.b.t. dierproeven en trends m.b.t. 3V alternatieven voor dierproeven:

Overkoepelende vraag

- Wat zijn volgens de beschikbare gegevens (bijv. volgens Zo doende, 2007) de toepassingsgebieden die het aantal dierproeven het meeste verhogen en het dierwelzijn het meeste verlagen en waaraan de trendanalyse dus prioriteit moet geven?

Proefdieren:

- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die de rol van het proefdier in het onderzoek zou kunnen doen versterken?
- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die de rol van het proefdier in het onderzoek zou kunnen doen afnemen?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van het proefdier voor het onderzoek doen toenemen?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van het proefdier voor het onderzoek doen afnemen?
- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste ontwikkelingen die ten goede zullen komen aan het welzijn van het proefdier?
- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste ontwikkelingen die ten koste zullen gaan van het welzijn van het proefdier?

Dierproeven:

- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die het gebruik van dierproeven zullen doen toenemen?
- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die het gebruik van dierproeven zullen doen afnemen?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van dierproeven doen toenemen?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van dierproeven doen afnemen?

Alternatieven voor dierproeven"

Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die het belang van alternatieven voor proefdieren (3V methoden) voor het onderzoek doen toenemen?

- Wat zijn volgens het veld de belangrijkste wetenschappelijke trends die een negatief effect kunnen hebben op het belang van alternatieven voor proefdieren?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van alternatieven voor dierproeven doen toenemen?
- Welke ontwikkelingen binnen het beleid (en de markt) kunnen het belang van alternatieven voor dierproeven doen afnemen?

Hoofdonderzoeksvraag 2:

- Wat zijn de belangrijkste kengetallen en parameters die kunnen worden gebruikt voor een periodieke monitoring van de trends op het gebied van proefdieren, dierproeven en alternatieven voor dierproeven. Mogelijk zijn bijvoorbeeld totaal aantal dieren, ongerief, diersoorten, gebruik van pijnstilling.

**Bijlage 8: Ontwikkeling 3V alternatieven**

De ontwikkeling van 3V alternatieven is in het algemeen beter gedocumenteerd voor het regulatorisch en toegepast onderzoek dan voor het fundamenteel onderzoek. Dit heeft onder andere te maken met het repeterende karakter dat regulatorisch en toegepast onderzoek kenmerkt en, in relatie tot regulatorisch onderzoek, met de noodzaak van acceptatie door regelevende instanties.

Vanwege de betere toegankelijkheid aan informatie wordt om de progressie op het gebied van 3V alternatieven te illustreren dan ook voorbeelden gebruikt uit de hoek van het regulatorisch en toegepast onderzoek. De eerste tabel geeft een overzicht van 3V alternatieven die in het afgelopen decennium zijn ontwikkeld en geïntroduceerd in de vrijgifte controle van vaccins. Tabel 2 laat de 3V alternatieven zien die door ECVAM zijn gevalideerd. Tabel 3 tenslotte geeft een overzicht van 3V projecten in het kader van het 6<sup>e</sup> en 7<sup>e</sup> Kaderprogramma van de Europese Commissie.

**Tabel 1. Europese Farmacopee: Werkzaamheidstest en progressie 3Vs in de kwaliteitscontrole van vaccins voor mens en dier.**

Vaccin	Werkzaamheids test	Dier model	3V alternatief	Soort V	Status Ph.Eur.
Alle vaccins	Challenge test met ernstig ongerief		Humane eidpunten	Verfijning	Geaccepteerd
Tetanus	Challenge test met ernstig ongerief	Muis/cavia	Serologie ipv challenge	Verfijning en Vermindering	Geaccepteerd
Difterie	Challenge test met ernstig ongerief	Cavia	Serologie ipv challenge	Verfijning en Vermindering	Geaccepteerd
Tetanus en difterie	Serologische test	Cavia	Enkelvoudige dosis	Vermindering	Geaccepteerd
Hepatitis B	Serologische test	Muis	Antigeen kwantificatie	Vervanging	Geaccepteerd na validatie
Kinderverlamming (geïnactiveerd)	Serologische test	Rat	Antigeen kwantificatie	Vervanging	Geaccepteerd na validatie
Hondsdolheid (cel cultuur, humaan gebruik)	Challenge test met ernstig ongerief	Muis	Enkelvoudige dosis	Vermindering	Geaccepteerd
Vlekziekte (varken)	Challenge test met ernstig ongerief	Muis	Serologie ipv challenge	Verfijning en Vermindering	Geaccepteerd
Ziekte van Weill (hond, niet-geadjuveerd)	Challenge test met ernstig ongerief	Hamster	Antigeen kwantificatie	Vervanging	Geaccepteerd na validatie
Clostridium novyi (type B) /perfringens/septicum	Toxin-neutralisatie test met ernstig ongerief	Konijn/muis	Serologie ipv challenge	Verfijning en Vermindering	Geaccepteerd
Newcastle disease (geïnactiveerd, Kip)	Challenge test met ernstig ongerief	Kip	Antigeen kwantificatie	Vervanging	Geaccepteerd na validatie

Ph.Eur. = Europese Farmacopee

**Tabel 2: ECVAM : gevalideerde alternatieven<sup>320</sup>**

### Scientifically Validated Methods

#### Acute aquatic toxicity

- **Testing Strategy to reduce the use of fish in acute aquatic toxicity testing**  
Date of the ESAC statement: 21 March 2006  
Status: ongoing development of OECD Guidance Document

#### Acute oral toxicity

- **Acute Toxic Class (ATC) Method for acute oral toxicity testing**  
Date of the ESAC statement: 31 October 2007  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)  
Status: regulatory accepted
- **Fixed Dose Procedure (FDP) for acute oral toxicity testing**  
Date of the ESAC statement: 31 October 2007  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)  
Status: regulatory accepted
- **Up-and-Down Procedure for acute oral toxicity testing**  
Date of the ESAC statement: 31 October 2007  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)  
Status: regulatory accepted

#### Eye irritation

- **Cytotoxicity/cell-function based in vitro assays (Cytosensor Microphysiometer *INVITTOX* Protocol 102 modified, Fluorescein Leakage *INVITTOX* Protocol 71) for eye irritation testing**  
Date of the ESAC statement: 10 July 2009  
Remarks: The ESAC statement is based on a retrospective data analysis. The tests are to be used within a tiered testing strategy as described in the statement.
- **The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) test methods for eye irritation**  
Date of the ESAC statement: 27 April 2007  
Remarks: the ESAC statement is based on the U.S. ICCVAM retrospective study  
Status: regulatory accepted

#### Genotoxicity

- **Micronucleus Test as an alternative to the *In Vitro* Chromosome Abberation Assay for genotoxicity testing**  
Date of the ESAC statement: 17 November 2006  
Status: ongoing development of Draft OECD Test Guideline 487 and under consideration for inclusion into EU Test Methods Regulation

#### Monoclonal antibodies production

---

<sup>320</sup> <http://ecvam.jrc.it/>

- ***In vitro* production of monoclonal antibodies**  
Date of the ESAC statement: 14 May 1998  
Remarks: the ESAC statement is based on a retrospective data analysis

#### Haematotoxicity

- **The Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage (CFU-GM) Assay for predicting acute neutropenia in humans**  
Date of the ESAC statement: 21 March 2006

#### Phototoxicity

- **3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test**  
Date of the ESAC statement: 20 May 1998, 03 November 1997  
Status: regulatory accepted

#### Pyrogenicity

- **Five *In Vitro* Pyrogen tests**  
Date of the ESAC statement: 21 March 2006  
Remarks: all five tests are indicated in the ESAC Statement  
Status: regulatory accepted

#### Reproductive and developmental toxicity

- **Embryonic Stem Cell Test (EST) for embryotoxicity**  
Date of the ESAC statement: 01 May 2002
- **Micromass (MM) embryotoxicity assay**  
Date of the ESAC statement: 01 May 2002
- **Whole Rat Embryo embryotoxicity assay**  
Date of the ESAC statement: 01 May 2002

#### Skin corrosion

- **EST-1000 method for skin corrosivity testing**  
Date of the ESAC statement: 12 June 2009  
Remarks: accepted for its use within OECD Test Guideline 431 and EU Test Method B.40 bis  
Status: compliant with regulatory guidelines
- **SkinEthic™ Human Skin Model for skin corrosivity testing**  
Date of the ESAC statement: 17 November 2006  
Remarks: accepted for its use within OECD Test Guideline 431 and EU Test Method B.40 bis  
Status: compliant with regulatory guidelines
- **CORROSITEX assay for skin corrosivity**  
Date of the ESAC statement: 06 December 2000  
Remarks: the ESAC statement is based on the outcome of the U.S. ICCVAM study  
Status: regulatory accepted

- **EPISKIN™ skin corrosivity test**  
Date of the ESAC statement: 03 April 1998  
Status: regulatory accepted (see section below)
- **Rat Transcutaneous Electrical Resistance (TER) skin corrosivity test**  
Date of the ESAC statement: 03 April 1998  
Status: regulatory accepted (see section below)
- **EpiDerm™ skin corrosivity test**  
Date of the ESAC statement: 21 March 1998  
Status: regulatory accepted

### Skin irritation

- **Two *in vitro* skin irritation tests: EpiDerm SIT and SkinEthic RHE assay**  
Date of the ESAC statement: 05 November 2008  
Remarks: stand-alone tests for the replacement of the Draize Skin Irritation Test  
Status: regulatory accepted
- **Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®) for skin irritation testing**  
Date of the ESAC statement: 27 April 2007  
Remarks: stand-alone test (EPISKIN®) for the replacement of the Draize Skin Irritation Test  
Status: regulatory accepted

### Skin sensitisation

- **Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) for skin sensitisation**  
Date of the ESAC statement: 27 April 2007
- **Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA)**  
Date of the ESAC statement: 21 March 1999  
Remarks: the ESAC statement is based on a retrospective data analysis  
Status: regulatory accepted

### Vaccines: potency and safety testing

- **ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines**  
Date of the ESAC statement: 28 June 2002  
Status: regulatory accepted
- **ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use**  
Date of the ESAC statement: 06 December 2000  
Status: regulatory accepted
- **Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use**  
Date of the ESAC statement: 06 December 2000  
Status: regulatory accepted

### Recommendations for Method Deletions

- **The batch potency testing of erythropoietin concentrated solution**  
Date of the ESAC statement: 28 June 2002
- **The relevance of the target-animal safety test for batch safety testing of vaccines for veterinary use**  
Date of the ESAC statement: 28 June 2002  
Remarks: The ESAC statement is based on a retrospective data analysis.

### Regulatory Acceptance

#### Acute oral toxicity

- **Deletion of the Acute Oral Toxicity test, Lethal Dose (LD<sub>50</sub>)**  
Regulation: the method has been deleted in 2001 from both the Annex V of Council Directive 67/548/EEC (Method B.1.), as well as from the OECD Test Guidelines (TG 401).
- **Up-and-Down Procedure for acute oral toxicity testing**  
Regulation: OECD Test Guideline 425 adopted December 2001  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)
- **Acute Toxic Class Method for acute oral toxicity testing**  
Regulation: Method B.1 tris of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in July 1996, updated in April 2004; updated OECD Test Guideline 423, adopted in December 2001.  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)
- **Fixed Dose Procedure for acute oral toxicity testing**  
Regulation: Method B.1 bis of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in July 1992, updated in April 2004; updated OECD Test Guideline 420, adopted in December 2001.  
Remarks: replacement of the acute oral toxicity test (the LD<sub>50</sub> method)

#### Eye irritation

- **The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) test methods for eye irritation**  
Regulation: OECD Test Guidelines 437 and 438, adopted in September 2009.  
Remarks: the ESAC statement is based on the U.S. ICCVAM retrospective study.

#### Phototoxicity

- **3T3 NRU phototoxicity test**  
Regulation: Method B.41 of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in April 2000; OECD Test Guideline 432, adopted in April 2004.

#### Pyrogenicity

- **Five *In Vitro* Pyrogen tests**  
Regulation: 1) the European Pharmacopoeia - the general method 2.6.30 *Monocyte-activation test* that covers the *in vitro* pyrogen tests was adopted by the European Pharmacopoeia Commission in March 2009; and 2) the US Food and Drug Agency (FDA) - the method was accepted in April 2009, following the peer review and recommendations of ICCVAM.

### Skin absorption

- **In vitro tests for skin absorption**  
Regulation: Method B.45 of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, adopted in May 2008; OECD Test Guideline 428, adopted in April 2004.

### Skin corrosion

- **EST-1000 method for skin corrosivity testing**  
Regulation: compliant with OECD Test Guideline 431 and EU Test Method B.40 bis as of June 2009.
- **SkinEthic™ Human Skin Model for skin corrosivity testing**  
Regulation: compliant with OECD Test Guideline 431 and EU Test Method B.40 bis as of November 2006.
- **CORROSITEX assay for skin corrosivity**  
Regulation: OECD Test Guideline 435, adopted in July 2006  
Remarks: the ESAC statement is based on the outcome of the U.S. ICCVAM study
- **EpiDerm™ skin corrosivity test**  
Regulation: Method B.40 bis of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in April 2000; OECD Test Guideline 431, adopted in April 2004.
- **EPISKIN™ skin corrosivity test**  
Regulation: Method B.40 bis of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in April 2000; OECD Test Guideline 431, adopted in April 2004.
- **Rat TER skin corrosivity test**  
Regulation: Method B.40 of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its Corrigendum, the method has originally been adopted in April 2000; OECD Test Guideline 430, adopted in April 2004.

### Skin irritation

- **Two in vitro skin irritation tests: EpiDerm SIT and SkinEthic RHE assay**  
Regulation: Method B.46 included into Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) in July 2009 during its 1<sup>st</sup> adaptation to technical progress (761/2009/EC).  
Remarks: development of Draft OECD Test Guideline ongoing.
- **Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®) for skin irritation testing**  
Regulation: Method B.46 included into Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) in July 2009 during its 1<sup>st</sup> adaptation to technical progress (761/2009/EC).  
Remarks: stand-alone test (EPISKIN®) for the replacement of the Draize Skin Irritation Test; EpiDerm® recommended as a screen test method or as part of a sequential testing strategy; development of Draft OECD Test Guideline ongoing.

### Skin sensitisation

- **Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA)**  
Regulation: Method B.42 of Annex to 440/2008/EC (EU Test Methods Regulation) and its

Corrigendum, the method has originally been adopted in April 2004; updated OECD Test Guideline 429, adopted in April 2002  
Remarks: the ESAC statement is based on a retrospective data analysis

#### Vaccines: potency and safety testing

- **The relevance of the target-animal safety test for batch safety testing of vaccines for veterinary use**  
Regulation: The target animal safety test can now be waived when a sufficient number (e.g. 10) of batches has been found to comply with the test. European Pharmacopoeia monograph: Vaccines for veterinary use (0062;2005)
- **ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines**  
Regulation: The method has been included in the monograph on swine erysipelas vaccine (European Pharmacopoeia, 4.6; No 01/2004:0064)
- **ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use**  
Regulation: The method has been included in the general text *2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed)* and adopted by the European Pharmacopoeia Commission in March 2003.
- **Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use**  
Regulation: The method has been included in the general text *2.7.8 Assay of tetanus vaccine (adsorbed)* and adopted by the European Pharmacopoeia Commission in March 2003.

Table 3: Overview of FP6 and FP7 projects on Alternative Testing Strategies<sup>321</sup>

Projects' technologies and approaches	Project	Description	Funding in Euro
Cell based technologies	ReProTect	Novel approaches in hazard and risk assessment of reproductive toxicity	9.100.000
	Vitrocello-mics	Reducing animal experimentation in preclinical predictive drug testing using ES cells	2.942.000
	MEMTRANS	Membrane transporters: in vivo models for the study of their role in drug fate	1.900.000
	EXERA	3D in vitro models for pharmaco-toxicological analysis	2.173.492
	INVITRO HEART	Reducing animal experimentation in drug testing by human cardiomyocyte in vitro models derived from ES cells	2.701.611
	LIINTOP	Liver and intestine in vitro models for pharmacokinetics and dynamics studies	2.933.291
	ARTEMIS	In vitro neural tissue system for replacement of TG animals with memory/learning def.	1.984.900
	ESNATS	ES cell-based alternative testing strategies	11.895.577
Integrated Testing Strategies	ACuteTox	Optimisation and pre-validation of in vitro test strategy for human acute toxicity	9.000.000
-omics, bioinformatics and computational biology	Predictomics	Short-term in vitro assays for long-term toxicity	2.259.754
	Sens-it-iv	Novel testing strategies for in vitro assessment of allergens	10.000.700
	carcinoGENOMICS	Development of high throughput genomics-based test for assessing genotoxic and carcinogenic properties of chemicals in vitro	10.440.000
	PREDICT-IV	Profiling toxicity: non-animal-based approach integrating toxicodynamics and biokinetics	11.330.907
Computational modelling and estimation techniques	OpenTox	Promotion, development, acceptance and implementation of QSARs for toxicology	2.975.360
High throughput techniques	TOXDROP	'Cell-on-chip' technology to screen chemicals for toxicity	1.615.887
	COMICS	Comet assay and array for efficient genotoxicity testing	3.189.385
	NanoTEST	Alternative testing strategies for assessment of toxicological profile of nanoparticles in	3.933.271

<sup>321</sup> European Commission. (2009). Alternative Testing Strategies. Progress Report 2009. EUR 23886

Bijlage 8: Ontwikkeling 3V alternatieven

---

		medical diagnostics	
Forums and workshops	CONAM	Consensus networking on alternatives	150.000
	SCARLET	SAR expert workshop in mutagenicity and carcinogenicity	112.840
	ForInViTox	Forum for researchers and regulators to meet manufacturers of toxicology test methods	288.850
	InViToPharma	Workshop in vitro toxicity tests within pharmaceutical industry	578.000
	START-UP	Scientific and technological issues in 3Rs alt. research in drug development	317.964

## Bijlage 9: Lijst met afkortingen

AAALAC	: Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
ADI	: Aanvraagbare Dagelijkse Inname
ADME	: Absorption, distribution, metabolism and excretion
AHAW	: Animal Health and Welfare Panel
AIDS	: Acquired Immuno-Deficiency Syndrome
AMS	: Accelerator mass spectrometry
ASAT	: Assuring Safety without Animal Testing
BMD	: Bench mark dose
BrF-ZEBET	: Bundesinstitut für Risikobewertung Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
CBG	: College ter Beoordeling van Geneesmiddelen
CBS	: Centraal Bureau voor de Statistiek
CCAC	: Canadian Council on Animal Care
CDER	: Center for Drug Evaluation and Research
cGMP	: current Good Manufacturing Practice
CHMP	: Committee for Medicinal Products for Human Use
CIOMS	: Council for International Organizations of Medical Sciences
COPD	: Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CTMM	: Center for Translational Molecular Medicine
CT-scan	: Computer Tomografie scan
CVMP	: Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
DEC	: Dierexperimenten Commissie
DG	: Directorate General
ECHA	: European Chemicals Agency
ECVAM	: European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDQM	: European Directorate for the Quality of Medicines
EFPIA	: European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations
EFSA	: European Food Safety Agency
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant assay
EMA	: European Medicines Agency
EPA	: US Environmental Protection Agency
EPAA	: European Partnership on Alternative Approaches to Animal Testing
ES cellen	: Embryonale stamcellen
ESF	: European Science Foundation
EUCOMM	: European Conditional Mouse Mutagenesis Program
EURCA	: European Resource Centre for Alternatives
FAO	: Food and Agriculture Organization
FCS	: Fetal Calf Serum
FELASA	: Federation of Laboratory Animal Science Associations
FP	: Framework Programme
GHS	: Globally Harmonised System
GLP	: Good Laboratory Practice
GM	: Genetisch gemodificeerd
GMO	: Genetisch gemodificeerd organisme
HESI	: Health and Environmental Sciences Institute
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HTS	: High Throughput Screening
ICH	: International Conference on Harmonisation
ILAR	: Institute Laboratory Animal Research
ILSI	: International Life Sciences Institute
iPS-cellen	: Induced pluripotent stem cells
ITS	: Intelligent (of Integrated) Testing Strategies
KNAW	: Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen
LAL	: Limulus Amebocyte Lysate
LD <sub>50</sub>	: Letale dosis 50

## Bijlage 9: Lijst met afkortingen

---

mAbs	: Monoclonale antistoffen
MIT	: Massachusetts Institute of Technology
mRNA	: messenger RNA
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
NKCA	: Nationaal Kennis Centrum Alternatieven voor dierproeven
NCA	: Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven
NC3R	: National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research
NGI	: Netherlands Genomics Initiative
NGO	: Niet-gouvernementele organisatie
NKI	: Nederlands Kanker Instituut
NOAEL	: No observed adverse effect level
NORINA	: Norwegian Reference Centre for Laboratory Animal Science
NVDEC	: Nederlandse Vereniging van Dierexperimentencommissies
NWO	: Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek
OCW	: Ministerie voor Onderwijs, Cultuur en Wetenschap
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
OESO	: Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OECD)
OIE	: Office international des épizooties
OMCL	: Official Medicines Control Laboratory Network
PBBK	: Physiologically Based Biokinetic modeling
PBPK	: Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling
PCR	: Polymerase chain reaction
PDMC	: Placenta Derived Multipotent Cells
PET	: Positronemissietomografie
Pow	: Partition coefficient
QA	: Quality Assurance
QSAR	: Quantitative structure-activity relationship
R&D	: Research & Development
rDNA	: Recombinant DNA
REACH	: Registratie, Evaluatie en Autorisatie van Chemische stoffen,
RIVM	: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RUN	: Radboud Universiteit Nijmegen
SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome
SCHER	: Scientific Committee on Health and Environmental Risks
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate - poly acrylamide gel electroforese
SPECT	: Single Photon Emission Computed Tomography
TB	: Tuberculosis
TG	: Transgeen
TI-Pharma	: Top Instituut Pharma
TNO	: Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk onderzoek
TTC	: Threshold of Toxicological Concern
UKCCCR	: United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research
3Vs	: Vervanging, Vermindering en Verfijning in het gebruik van proefdieren
VWA	: Voedsel en Waren Autoriteit
VWS	: Ministerie voor Volksgezondheid, Welzijn en Sport
WHO	: World Health Organization
Wod	: Wet op de dierproeven
WTO	: World Trade Organization