

# Kan het ook anders?

BESCHOUWINGEN OVER ALTERNATIEVEN  
VOOR DIERPROEVEN

JAC. SWART, GENY GROOTHUIS,  
JEAN HORBACH, EN JAN VAN DER VALK (RED.)



Kan het ook anders?

# Kan het ook anders?

## Beschouwingen over alternatieven voor dierproeven

*Redactie:  
Jac. Swart,  
Geny Groothuis,  
Jean Horbach  
en Jan van der Valk*

 DAMON

Reeds eerder verschenen in deze serie:

Jac. Swart, Jan Wolters, Hub Zwart (red), *DEC's in discussie, De beoordeling van dierproeven in Nederland*, 2004, ISBN 90 5573 538 8

Kan het ook anders?

Beschouwingen over alternatieven voor dierproeven.

Redactie:

Jac. Swart, Geny Groothuis, Jean Horbach, en Jan van der Valk

Deze publicatie werd mede mogelijk gemaakt door Harlan Nederland B.V. en een aantal andere organisaties

ISBN 90 5573 734 8

Isbn 978 90 5573 734 5

NUR 730/942

Trefw.: proefdieren, dierethiek, bio-ethiek, dierwetenschappen

Copyright © 2006 Uitgeverij DAMON Budel

Alle rechten voorbehouden. Niets van deze uitgave mag worden veeleevuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Voor zover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van artikel 16B Auteurswet 1912 juncto het Besluit van 20 juni 1974, St.b. 351, zoals gewijzigd bij het Besluit van 23 augustus 1985, St.b. 471 en artikel 17 Auteurswet 1912, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoedingen te voldoen aan de Stichting Reprorecht (Postbus 3060, 2130 KB Hoofddorp). Voor het overnemen van gedeelte(n) uit deze uitgave in bloemlezingen, readers en andere compilatiewerken (artikel 16 Auteurswet 1912) dient men zich tot de uitgever te wenden.

Reeks: Dierproeven

Deel 2

Onder verantwoordelijkheid van de Nederlandse Vereniging van Dierexperimentencommissies

Reeks-redactie:

Hub Zwart (voorzitter), Wilbert Frieling, Harry van Herck, Elsbeth Noordhuizen-Stassen, Jac. Swart

[nvdec@gdl.uu.nl](mailto:nvdec@gdl.uu.nl)

Realisatie: Uitgeverij DAMON bv

ISBN 90 5573 734 8

Isbn 978 90 5573 734 5

# Inhoud

|  |    |
|--|----|
| Of het ook anders kan?<br><i>Jac. Swart, Geny Groothuis, Jean Horbach en Jan van der Valk</i>                          | 7  |
| Over de geschiedenis en de betekenis van de term alternatieven<br><i>Jan Vorstenbosch</i>                              | 22 |
| Het dier als alternatief bij dierproeven<br><i>Frans Stafleu</i>   | 33 |
| Zijn dierproeven noodzakelijk?<br><i>Frank Wassenberg</i>  | 42 |
| De kanarie in de kolenmijn: de mens als alternatief<br><i>Cees Smit</i>  | 51 |
| Dierproeven binnen de farmaceutische industrie:<br>hoe zit het met Organon?<br><i>Gerrit Jan Wennink</i>               | 61 |
| <i>In vitro</i> toxicologie als alternatief voor het gebruik van proefdieren<br><i>Willem Schoonen en Jean Horbach</i> | 70 |
| Onderzoek met menselijk weefsel: een humaan alternatief?<br><i>Geny Groothuis en Jan van der Valk</i>                  | 80 |
| Dierproeven en 3 V methoden in de ontwikkeling en<br>controle van vaccins<br><i>Coenraad Hendriksen</i>                | 90 |
| Genomics en alternatieven voor dierproeven<br><i>Marjolein M.F. van Boxel</i>  | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| De computer als alternatief?<br><i>Lars Ridder</i>  | 109 |
| Dierproeven in het onderwijs<br><i>René Remie en Jan van der Valk</i>   | 118 |
| Op zoek naar alternatieven voor dierproeven.<br>Informatie met betrekking tot zoekprocessen en de keuze<br>van de databases op het gebied van alternatieven<br>voor dierproeven<br><i>Theo Bakker</i> | 130 |
| De lange weg naar de begrenzing van dierproeven.<br>Waarom de wetenschap bepaalt en de dierenbescherming<br>baalt zolang de politiek draalt<br><i>Bob van den Bos</i>                                 | 143 |
| De overheid en alternatieven voor dierproeven<br><i>Iris Arendzen</i>   | 152 |
| De rol van ECVAM in het valideren en implementeren van<br>alternatieven voor proefdieren<br><i>Sandra Coecke, Greetje Elaut en Thomas Hartung</i>   | 163 |
| Is REACH <i>reachable</i> met minder dierproeven?<br><i>Ineke Gubbels</i>   | 175 |
| Nieuwe Europese regelgeving geeft aanzet tot slimmer<br>testen van toxiciteit<br><i>Cyrille Krul, Andreas Freidig en Han van de Sandt</i>   | 184 |
| VVV – de Brusselse paradox<br><i>Pleun Honig</i>  | 194 |
| Personalia auteurs  | 203 |

# Of kan het ook anders?

*Jac. Swart, Geny Groothuis, Jean Horbach en Jan van der Valk*

## **Introductie**

De meeste mensen zijn van mening dat dieren en zeker gewervelde dieren kunnen lijden en daarom belangen hebben: het voorkomen van dat lijden. Bovendien bezitten dieren volgens velen een intrinsieke waarde die men niet zonder goede reden mag aantasten. Deze morele status werpt vragen op indien dieren voor bepaalde doeleinden worden gebruikt. Een van die doeleinden is het wetenschappelijke experiment waarin het dier meestal model staat voor de mens. Door middel van zogenaamde dierproeven wordt kennis vergaard over de werking van het lichaam, over de mogelijke schadelijkheid van stoffen en de werkzaamheid van geneesmiddelen.

Indien een dierproef niet noodzakelijk is om een bepaald algemeen aangevaamd doel te bereiken of als er alternatieven bestaan om dat zelfde doel te bereiken dan is een dierproef in Nederland wettelijk niet toegestaan. Behalve dat het berokkende ongerief moet worden afgewogen tegen het maatschappelijke en wetenschappelijke belang dient daarom ook onderzocht te worden of er relevante alternatieven bestaan. Het belang van alternatieven vertaalt zich in het feit dat onderzoekers in Nederland in hun onderzoeksprotocollen, ter beoordeling door Dierexperimentencommissies, moeten aangeven of er alternatieven zijn. Indien dit het geval is moeten die ook worden toegepast.

Wat moet onder een alternatief worden verstaan? Wie dat aan een buitenstaander vraagt, zal vermoedelijk als antwoord krijgen dat dit een experiment is waarin geen gebruik wordt gemaakt van proefdieren om de onderzoeksvraagstelling te beantwoorden. Dat zou bijvoorbeeld onderzoek met behulp van celkweken en micro-organismen kunnen zijn. Dit worden *in vitro* (in glas) methoden genoemd omdat de experimenten vaak in petrischalen of reageerbuizen worden uitgevoerd hoewel die tegenwoordig van kunststof zijn. Proeven in levende dieren worden daarentegen vaak *in vivo* (in het levende) methoden genoemd. Een andere aanpak is het gebruik van computermodellen of elektronische databases. Deze worden *in silico* methoden genoemd naar het belangrijkste bestanddeel, silicium, waar computerchips van worden gemaakt.

In kringen van deskundigen wordt echter een ruimere betekenis dan de bovenstaande aan het begrip alternatief toegekend. Men verwijst veelal naar de drie V's van Vervanging, Vermindering en Verfijning van dierproeven. Dit concept werd door Russell & Burch in 1959 geïntroduceerd (Russel & Burch, 1959). Michael Balls (1994, p. 195) vat deze benadering als volgt samen: "Alternatives to animal experiments are procedures which can completely replace the need for animal experiments, reduce the numbers of animals required, or diminish the amount of pain or distress suffered by animals in meeting the essential needs of man and other animals" (p. 195). Een alternatief voor een dierproef houdt volgens deze interpretatie dus niet persé proefdiervrij in. Maar, het zal geen verbazing wekken dat een organisatie als Proefdiervrij de nadruk legt op vervanging en veel minder op vermindering of verfijning.

De wettelijke verplichting alternatieven voor dierproeven toe te passen indien voorhanden en bruikbaar om de onderzoeksvraag te beantwoorden, maakt dat het zoeken naar alternatieven niet vrijblijvend is. Gechargeerd zou men zelfs kunnen zeggen dat een alternatief eigenlijk de standaard is en de dierproef het alternatief (indien niets anders mogelijk is). Het begrip alternatief heeft echter vooral betrekking op nieuwe technieken en methodieken die bijdragen aan de drie V's van dierexperimenten. Als deze nieuwe technieken eenmaal zijn geaccepteerd, zijn het geen alternatieven meer maar standaarden. Een alternatieve techniek of methodiek heeft dus in een bepaald onderzoeksveld een beperkte levensduur en gaat na acceptatie als standaard verder door het leven totdat zij vervangen wordt door een nieuw alternatief dat dan de standaard wordt. Vanuit dit perspectief is het duidelijk dat een optimale proefopzet en het gebruik van goede statistische methoden niet als alternatieven moeten worden beschouwd maar als een kwestie van goed onderzoek doen. Alleen nieuwe statistische methodieken en nieuwe 3 V's genererende proefopzetten kunnen als alternatief gelden.

### *De opkomst van alternatief*

De drie V's zijn als een operationalisering op te vatten van het streven gehoor te geven aan de maatschappelijke weerstand tegen dierproeven. De reden hiervoor is duidelijk: aan het doen van dierproeven kleven morele bezwaren en een alternatief waaraan minder bezwaren kleven (minder ongerief, behoud van de integriteit of intrinsieke waarde, minder dieren, andere of 'lagere' dieren, etc.) heeft de voorkeur. Onderzoekers kunnen echter ook



andere redenen hebben om de drie V's na te streven: proefdieren zijn soms duur en alternatieven liggen goed in de samenleving en voorkomen daarom een hoop narigheid.

Ook criticasters van dierproeven hebben soms niet-morele motieven voor hun afwijzing van dierproeven. Zo is er een debat gaande over de vraag of inzichten gebaseerd op dierproeven wel voldoende gelden voor mensen. Op basis van wetenschapsfilosofische en evolutionaire gronden en gebruikmakend van toxicologische bevindingen betogen een aantal critici dat de verdedigers van dierproeven een 18<sup>e</sup> eeuws en gedateerd paradigma hantieren dat er ten onrechte vanuit gaat dat dieren als model voor mensen kunnen dienen. Zie Festing & Greek (2003) voor een discussie tussen opposanten in dit debat.

Welke reden men ook heeft om alternatieven na te streven, feit is dat alternatieven steeds belangrijker worden geacht. De eerder geciteerde Michael Balls stelt in zijn overzichtsartikel dat de operationalisering van het begrip alternatieven in de drie V's zeer belangrijk is omdat "too much time has been wasted over the years in semantic discussions on the meaning of 'alternatives' and on whether other terms, such as 'adjunct', 'complementary' or 'substitute' would be preferable" (Balls, 1994, p. 195). Met andere woorden, met de vestiging van het begrip 'alternatieven' werd volgens deze auteur een discussie afgesloten en, zo kan men uit de toon aflezen, kon er eindelijk werk van alternatieven gemaakt worden. Dat is ook gebeurd. Balls somt in zijn overzicht een lange lijst op van institutionele en beleidsmatige ontwikkelingen die vorm hebben gegeven aan de implementatie van de drie V's. Zijn artikel stamt van al meer dan 10 jaar geleden en in die tussentijd hebben ontwikkelingen niet stil gestaan.

Alternatieven hebben in de dierproevenwereld dus een serieuze plek gekregen. De operationalisering van alternatieven voor dierproeven in de drie V's lijkt groepen met uiteenlopende belangen en visies te binden omdat het concept de gemeenschappelijke zorg uitdrukt dat dierproeven moreel problematisch zijn zonder dat het dierproeven onmogelijk maakt. Zo stelt de Sophia Vereniging op haar website dat zij streeft naar de afschaffing van dierproeven. Zij wil zich echter ook inzetten voor het dier in de proeven "aangezien zij zich ervan bewust is dat het volledig afschaffen van dierproeven in de nabije toekomst niet haalbaar is".<sup>1</sup> Ook de Dierenbescherming pleit voor een verbod op dierproeven. Echter, zo zegt deze organisatie,

1 <http://www.sophiavereniging.nl/informatie/dierproeven.php?i=3>

“zolang dierproeven een maatschappelijke realiteit zijn en een fundamenteel gezondheidsbelang dienen voor mens en dier, werken wij met de ‘stap-voor-stap’-benadering, uitgaande van de 3 V’s”. Evenzo stelt het zo door dierenactivisten gehekelde en belaagde onderzoeksinstituut BPRC: “hoewel het niet reëel is te verwachten dat er in de nabije toekomst helemaal geen dierproeven meer nodig zijn om nieuwe medicijnen te ontwikkelen, juichen onderzoekers geschikte alternatieven voor het gebruik van dieren van harte toe”.<sup>2</sup> Dat het begrip alternatieven zo pacificerend heeft gewerkt, heeft ongetwijfeld ook te maken met de overtuiging dat de toepassing van de drie 3 V’s goede wetenschap niet in de weg hoeft te staan: “The greatest scientific experiments have always been the most humane and the most aesthetically attractive, conveying that sense of beauty and elegance which is the essence of science at its most successful” aldus de Verklaring van Bologna (1999) in navolging van Russel & Burch (1959).<sup>3</sup> Volgens Balls (1996, p. 1) is de grootste waarde van het concept van de 3 V’s dat het samenwerking bemoedigt tussen hen die anders verdeeld zouden zijn. “Those who want to see the fastest possible end to all experimentation can work to reduce, refine and replace with those whose current responsibilities make some animal use unavoidable”.

### *In hoeverre zijn alternatieven mogelijk?*

De Nederlandse wetgeving mag dan wel verplicht stellen dat alternatieven voor dierproeven, indien beschikbaar, moeten worden toegepast, in de praktijk gaat dat minder gemakkelijk dan op papier. Er zijn een aantal factoren aan te wijzen die bepalend zijn voor de mogelijkheid alternatieven toe te passen:

- De vraagstelling van de proef moet ruimte bieden aan alternatieven. Indien het doel van de dierproef intrinsiek verbonden is aan dierexperimentele handelingen zoals bij een fundamenteel wetenschappelijke vraag m.b.t. de fysiologie, anatomie of het gedrag van levende dieren dan is een dierproefvrije opzet vaak niet goed mogelijk, maar wellicht kunnen wel vermindering en verfijning worden bereikt.

2 Biomedical Primate Research Centre: <http://www.bprc.nl/BPRC/NL/L3/RRR.html>, geraadpleegd op 19 januari 2006.

3 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, Italy, on 31 August 1999. Zie <http://www.ufaw.org.uk/Annual%20report%202000/Bologna.htm> geraadpleegd op 20 januari 2006.

- Alternatieven moeten bekend zijn. Er zijn tegenwoordig talloze websites waarop informatie over de mogelijkheden staat aangegeven. Zie ook bijvoorbeeld de onderwijsalternatievenbundel “From guinea pig to computer mouse” (Jukes en Chiuiua, 2003).
- Alternatieven moeten toegestaan zijn. Met name veiligheidsonderzoek naar geneesmiddelen vergt wettelijk verplichte dierproeven. Alternatieven zijn daarbij soms wel mogelijk maar niet toegestaan. Elders in deze bundel wordt hier uitgebreid op ingegaan.
- De proefopzet moet ruimte geven voor alternatieven. Vermindering van het aantal dieren en verfijning van de proef zijn soms mogelijk door een andere proefopzet te kiezen. Nieuwe meet- en onderzoekstechnieken en -methoden en een goede statistiek kunnen hierbij ondersteunend werken. Ook hiervoor geldt dat er talloze nieuwe methoden worden ontwikkeld.
- De vraagstelling van de proef moet ruimte bieden aan alternatieven. Indien het doel van de dierproef intrinsiek verbonden is aan dierexperimentele handelingen zoals bij een fundamenteel wetenschappelijke vraag m.b.t. de fysiologie, anatomie of het gedrag van levende dieren dan is een dierproefvrije opzet vaak niet goed mogelijk, maar wellicht kunnen wel vermindering en verfijning worden bereikt.
- Er dient bereidheid te bestaan voor de acceptatie en het gebruik van alternatieven bij de onderzoeker, vergunninghouders, regelgevers, opdrachtgevers en financiers van dieronderzoek. Die bereidheid of het ontbreken ervan hangt eveneens samen met paradigma's over de rol en de zeggingskracht van dierproeven voor medisch onderzoek. Zie ook het recente rapport van de Nuffield Council of Bioethics (2005) voor een discussie over dit onderwerp.

Met name de rol van de vraagstelling en de proefopzet in bovengenoemde punten laat zien dat de mogelijkheden voor en het streven naar alternatieven een integraal onderdeel vormen van het onderzoek zelf. Alternatieven kunnen volgens voorstanders ook bijdragen aan de kwaliteit van onderzoek door haar nadruk op een statistische onderbouwing van de vereiste aantallen proefdieren, de kritische benadering bij het extrapoleren van proefdiervrijresultaten naar de mens en de vaak nauwkeurige metingen die proefdiervrije alternatieven kunnen opleveren in vergelijking met metingen in levende dieren. “Humane science is good science” is de gevleugelde frase waarmee wordt aangegeven dat indien het lijden van dieren zoveel mogelijk wordt geminimaliseerd ook meer betrouwbare uitkomsten worden verkregen. De andere

kant van deze ontwikkeling is dat sommigen het concept van de drie V's als onderdeel van een systeem zijn gaan beschouwen dat de afhankelijkheid van dierproeven juist vergroot: "The 3 R's is mainly supported by those with a vested interest in animal experimentation. The 3 R's allows those with a vested interest to avoid entering into any dialogue about the scientific validity of interspecies extrapolation. Anyone who endorses the 3 R's acknowledges that animal experiments are useful and necessary and that they cannot be abolished until all such experiments, of which there are millions, are replaced by non-animal methods" aldus het echtpaar Greek (Greek & Greek, 2002, p.25).

### **De opzet van de bundel**

Bovenstaande introductie laat zien dat hoewel alternatieven voor dierproeven zijn geaccepteerd en een plaats hebben gekregen in de regelgeving er nog veel voetangels en klemmen zijn bij het ontwikkelen en implementeren van alternatieven. In deze bundel leveren een keur van auteurs een bijdrage over alternatieven voor dierproeven. Daarbij zijn drie groepen van bijdragen te onderscheiden. Ten eerste een aantal artikelen over de achtergronden van alternatieven. Definities, ethiek en visies op alternatieven voor dierproeven komen hierbij aan de orde. In de tweede groep van essays wordt een aantal ontwikkelingen m.b.t. alternatieven geschetst in de praktijk van onderwijs en onderzoek. De bijdragen over het onderzoek hebben daarbij vooral betrekking op onderzoek aan geneesmiddelen en vaccins (ontwikkeling, productie, testen) waarbij met name toxicologische risico's belangrijk zijn. De keuze hiervoor hangt samen met het feit dat dit soort van onderzoek bijna de helft van alle dierproeven voor haar rekening neemt. Een groot deel is daarbij wettelijk verplicht en uniform van opzet. Vanwege dit laatste kunnen alternatieven, indien geaccepteerd, breed worden ingezet waarbij veel 3 V-winst kan worden behaald. De derde groep van artikelen gaat over het beleid rondom dierproeven. Alhoewel de term alternatieven voor dierproeven betrekking heeft op onderzoek, is beleid hieromtrent van groot conditioneel belang. Het beleid bepaalt deels de mogelijkheden en ruimte en kan het gebruik van alternatieven door en de verspreiding onder onderzoekers stimuleren.

De artikelen vormen door de keuze van deze drie verschillende invalshoeken een caleidoscopisch geheel waarin historische, ethische, technische en beleidsmatige stijlen en benaderingen zijn te onderscheiden. De auteurs zijn afkomstig uit zeer verschillende disciplines. Een overzicht van de artikelen wordt in onderstaande sectie gegeven.

### *Achtergronden en visies op alternatieven voor dierproeven*

Jan Vorstenbosch gaat in op de verschillende betekenissen van de term alternatieven. De term kwam in de jaren zeventig van de vorige eeuw in zwang en is verbonden met meer en minder radicale opvattingen over de mogelijkheid van alternatieven voor dierproeven. De term kreeg een maatschappijkritische en morele betekenis die verder ging dan de door de Russell en Burch voorgestelde benadering die vooral op wetenschappers was gericht en ook wetenschappelijke winst vooronderstelde door het gebruik van alternatieven. Vorstenbosch betoogt dat de term alternatieven mede door de beleidsmatige inbedding een morele betekenis heeft gekregen en dat ook moet hebben. Die beleidsmatige context vereist tegelijk helderheid in de betekenis van het begrip 'alternatief'. Hij werkt daarom een definitie van het begrip alternatieven uit welke de door Russell en Burch voorgestelde drie V's omvatten.

Eén van door Russell en Burch voorgestelde V's heeft betrekking op vervanging. Frans Stafleu gaat in op de vraag of de ene soort een vervanging kan zijn voor een andere soort. Hij concludeert dat dierproeven op gespannen voet staan met de uitgangspunten van verschillende ethische theorieën. Zij leveren echter wel aanwijzingen op om soms onderscheid te maken tussen diersoorten. Het te verwachten leed, het nut voor de mens en de mate waarin een dier bewustzijn heeft, zijn daarbij belangrijke parameters. Tenslotte concludeert de auteur dat mens en proefdier beter geen wederzijdse band kunnen ontwikkelen omdat die band onvermijdelijk door de uitvoering van de proef wordt gebruuskeerd. Dit is voor de auteur reden te pleiten geen diersoorten te gebruiken waarmee wij gemakkelijker een band ontwikkelen, behalve als dat strikt noodzakelijk is.

Met die verwijzing naar noodzaak zijn we gelijk bij een ander thema belandt: hoe noodzakelijk zijn dierproeven en heeft het zin om over alternatieven te praten als de noodzaak daartoe afwezig is? Frank Wassenberg betoogt dat dierproeven nooit als noodzakelijk kunnen worden beschouwd omdat zij slechts een middel zijn om een doel, kennis over ziekten bij de mens, te kunnen realiseren. Doel en middel worden volgens hem vaak verward waardoor dierproeven ten onrechte als standaard voor kennisverwerving worden gezien. Dierproeven zijn volgens de auteur niet noodzakelijk, hooguit geldt de noodzaak voor het gestelde kennisdoel dat met de dierproef kan worden bereikt. Daarom moet het begrip alternatief met een vierde V van 'Voorkomen' worden uitgebreid.

Die noodzaak van kennis over humane ziekten wordt ook door Cees Smit benadrukt. Zonder die kennis zou het met de gezondheid en levensver-

wachting van veel mensen veel minder goed zijn gesteld. Dierproeven zijn daarbij volgens hem onontbeerlijk geweest en hebben ook voor de diergeneeskunde veel opgeleverd. Dat neemt niet weg dat er naar alternatieven moet worden gezocht, juist om het onderzoek naar belangrijke ziekten gaande te kunnen houden. Patiënten blijken daarbij soms ook als alternatief te fungeren zoals de praktijk van AIDS-onderzoek en onderzoek naar bijwerkingen van geneesmiddelen bewijzen. Onderzoekers zouden daarom meer met patiëntenorganisaties moeten samenwerken om alternatieven te bewerkstelligen.

Evenals Cees Smit vindt ook Gerrit-Jan Wennink dat dierproeven niet gemist kunnen worden. Ze zijn een noodzakelijk kwaad. Er is echter zeker winst te halen. Hij schetst het beleid bij het farmaceutische bedrijf Organon dat aan alternatieven voor dierproeven een hoge prioriteit geeft vanuit haar visie op Sociaal Verantwoord Ondernemen. Volgens de auteur is het aantal dierproeven bij het bedrijf met bijna een factor 5 gedaald sinds de jaren zeventig terwijl onderzoeksactiviteiten alleen maar zijn toegenomen. Veel dierproeven worden echter wettelijk voorgeschreven waardoor vervanging soms wordt belemmerd. Dat betekent niet dat er geen verbeteringen mogelijk zijn. De meeste winst kan volgens hem worden behaald door een betere voorselectie van stoffen op toxische en werkzame eigenschappen te realiseren waardoor voorkomen kan worden dat sommige stoffen op dieren moeten worden getest.

### *Alternatieven in de praktijk van onderwijs en onderzoek*

Willem Schoonen en Jean Horbach gaan verder door op het thema dat Gerrit-Jan Wennink aanroert, namelijk de voorselectie op toxiciteit. Een van de grootste problemen bij het ontwikkelen van nieuwe medicijnen is mogelijke humane toxiciteit. Het is de belangrijkste reden om een potentiële stof uit een ontwikkelingstraject te nemen. Veel toxiciteitsproeven worden met proefdieren uitgevoerd. Indien *in vitro* en *in silico* proeven een sterke indicatie geven van toxiciteit dan kunnen stoffen eerder uit het ontwikkeltraject worden genomen waarmee dierproeven dus worden voorkomen. Genomics en databasemethodieken die gebruik maken van gegevens afkomstig uit dierproeven kunnen hieraan een grote bijdrage leveren.

Een potentiële alternatieve methode is het gebruik van humaan weefsel voor toxiciteit- en farmacologieproeven. Geny Groothuis en Jan van der Valk gaan op deze methodiek in. Humaan weefsel heeft een groot wetenschappelijk voordeel: de stap naar de mens is al gemaakt, alhoewel daar weer ande-

re problemen tegenover staan. Voor een groot deel hebben deze problemen met ethische en logistieke aspecten te maken. Men kan niet zomaar over humaan weefsel beschikken en patiënten dienen in het algemeen hiervoor toestemming te geven. Daarnaast ontbreekt veel informatie over vraag en aanbod. Internationale humaan weefselbanken zouden hier een oplossing kunnen zijn maar de internationale regelgeving is nogal gevarieerd en levert daarom barrières op.

Naast de ontwikkeling van medicijnen vergt ook vaccinonderzoek veel dierproeven. Coenraad Hendriksen schetst de ontwikkeling van alternatieven bij het onderzoek naar en de productie van vaccins. Bij de productie van vaccins zijn grote successen geboekt en is het gebruik van levende dieren zeer sterk afgenomen. Voor de ontwikkeling van vaccins en voor routineonderzoek aan geproduceerde batches zijn dierproeven helaas vaak nog onontbeerlijk. Bovendien gaan deze gepaard met relatief veel ongerief. Een van de grootste problemen blijkt de acceptatie van alternatieven door de autoriteiten te zijn. Veiligheid en werkzaamheid staan hoog op de lijst en de acceptatie van een alternatief kan daarom zeer lang duren. De auteur laat zien dat ook daar winst kan worden behaald en ook wordt verwacht in de nabije toekomst.

Verskillende auteurs verwijzen naar de rol van genomics in de ontwikkeling van alternatieven. Marjolein van Boxel gaat hier dieper op in en schetst een overzicht van deze en verwante technieken. Zij laat zien dat met name door de ontwikkeling van biomarkers, die met genomics technieken kunnen worden vastgesteld, verfijning en vermindering mogelijk zijn. De opkomst van genomics en hieraan gerelateerde technieken geven een nieuwe dimensie aan de zoektocht naar alternatieven maar leveren ook nieuwe problemen op. Een groot probleem is bijvoorbeeld de interpretatie van genomicsgegevens in termen van klassieke *in vivo* proeven die de “gouden standaard” zijn. Van belang is ook dat men zich realiseert dat op het niveau van het organisme zich andere en ook relevante biologische processen afspeelen dan op moleculair en genniveau. Veel onderzoek is daarom nog nodig en dat zal aanvankelijk zelfs meer dierproeven vergen.

Behalve genomics vormt ook het gebruik van computers, ofwel *in silico* methoden, een belangrijk hulpmiddel bij het ontwikkelen van alternatieven bij het onderzoek naar nieuwe medicijnen. Lars Ridder schetst in zijn bijdrage hoe met behulp van computers van nog niet bestaande stoffen mogelijk relevante eigenschappen kunnen worden vastgesteld. Verder kunnen *in vitro* gegevens met computerprogramma's en databases worden geïn-

terpreteerd m.b.t. tot eigenschappen als opname, metabolisme en toxiciteit van een te testen stof, wat voorselectie mogelijk maakt. Deze methoden vervangen dierproeven niet maar ze leiden wel tot verfijning en vermindering. Belangrijk is dat de nieuwe methoden gevalideerd worden. De auteur pleit daarom voor een permanente terugkoppeling van *in silico* methoden naar experimentele *in vitro* en *in vivo* gegevens.

Behalve bij onderzoek worden ook dierproeven in het wetenschappelijke onderwijs uitgevoerd. René Remie en Jan van der Valk geven aan dat sinds de jaren zeventig van de vorige eeuw het aantal onderwijsdierproeven meer dan gehalveerd is. Met name de opkomst van simulatoren zoals computerprogramma's hebben een bijdrage geleverd aan de reductie van het aantal dierproeven. Zij kunnen zelfs superieur zijn aan dierproeven omdat herhaling en correctie veel meer mogelijk zijn. Niettemin maken de auteurs duidelijk dat dierproeven niet helemaal verbannen kunnen worden uit het onderwijs. Het uitvoeren van dierproeven is een vaardigheid die geleerd moet worden zolang dierproeven nodig zijn. Dieren zijn gebaat bij onderzoekers die getraind zijn in een juiste omgang met dieren. Wel zou de noodzaak van dierproeven in het onderwijs verbonden moeten zijn aan de mate waarin een student zich specialiseert in een discipline waarin dierproeven noodzakelijk zijn.

Een van de hindernissen om alternatieven toe te passen is onvoldoende kennis van onderzoekers en docenten over bestaande alternatieven. Databases, al dan niet publiek toegankelijk, kunnen hierbij een belangrijke rol spelen. Dit kan de kennis over bestaande alternatieven bevorderen en voorkomen dat het spreekwoordelijke wiel weer uitgevonden wordt. Theo Bakker voorziet de lezer van vooral praktische wenken om databases te doorzoeken die steeds meer beschikbaar komen, met name via het Internet. In de bijlage van zijn bijdrage voorziet hij de lezer van een uitgebreide lijst van beschikbare databases.

### *Nederlands en Europees beleid*

De Nederlandse wetgeving omtrent dierproeven schrijft het gebruik van alternatieven voor indien zij beschikbaar zijn. Deze wetgeving is niet in een achternamiddag tot stand gekomen. Bob van den Bos beschrijft hoe na meer dan een eeuw van strijd een wetgeving over dierproeven en alternatieven werd gerealiseerd. Daarbij rijst het beeld op van vertraging, uitstel en afstel. Een sterke lobby van belanghebbenden in het dieronderzoek, een compromisloze opstelling van critici en een slappe opstelling van parlementariërs



worden opgevoerd als oorzaken. Uiteindelijk hebben sinds de jaren zeventig van de vorige eeuw maatschappelijke druk, internationale ontwikkelingen en een andere opstelling van belangenorganisaties tot de huidige Wet op de dierproeven (Wod) geleid.

Iris Arendzen beschrijft in haar bijdrage het proefdierenbeleid als het duivelse dilemma tussen maatschappelijke waarden als gezondheidszorg en veilige producten enerzijds en de gevolgen voor proefdieren anderzijds. Alternatieven voor dierproeven kunnen dit dilemma verkleinen en zijn daarom een belangrijk beleidsdoel van de overheid. Naast de totstandkoming van de Wet op de dierproeven heeft het beleid voor alternatieven institutioneel vorm gekregen door de instelling van nieuwe organisaties. Allereerst het Platform Alternatieven voor Dierproeven (PAD) waaraan belangrijke actoren zoals de dierenbelangenorganisaties, industrie en ministeries deelnemen. Vervolgens zijn het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA) en het onderzoeksprogramma “Dierproeven begrensd” van ZonMw tot stand gekomen. Ondanks beperkende financiële condities wordt het alternatievenbeleid nu verder voortgezet, mede gestimuleerd door Europese ontwikkelingen.

Een van die Europese ontwikkelingen is het Europese plan om in 2007 een veiligheidsregelgeving te introduceren voor alle stoffen die op de Europese markt zijn. Met name van de 30.000 stoffen die voor 1981 op de markt zijn gekomen, zijn nauwelijks toxicologische gegevens bekend. Met deze nieuwe zogenaamde REACH regelgeving wordt op dit gebied een inhaalslag gemaakt. Sandra Coecke en haar collega's beschrijven de rol van ECVAM, het Europese Centrum voor de Validatie van Alternatieve Methoden bij het ontwikkelen van alternatieven in het kader van het Europese REACH-programma dat naar verwachting tot een sterke stijging van het proefdiergebruik zal leiden indien geen alternatieven worden toegepast. REACH vormt daarom voor het ECVAM een grote uitdaging.

Ineke Gubbels gaat ook in op het REACH programma en beschrijft de mogelijke alternatieven onder de REACH regelgeving. Zij concludeert dat de zogenaamde “Weight of evidence” benadering gecombineerd met computerondersteunde methodieken nu al veel mogelijkheden biedt. Dit geldt ook voor de zogenaamde groepsbenadering waarbij de toxiciteitinschatting van een stof mede wordt gebaseerd op de eigenschappen van de groep waartoe het behoort. Veel alternatieven moeten echter nog verder worden ontwikkeld voordat ze breed toepasbaar zijn. Daarnaast vormen de relatieve onbekendheid van alternatieven bij de industrie, de korte tijdsperiode en de

relatief hoge prijs van alternatieven grote obstakels voor de implementatie ervan. Het REACH programma vormt evenwel ook een grote stimulans voor de ontwikkeling van alternatieven die ook in geheel andere domeinen hun toepassing kunnen vinden.

Ook Cyrille Krul en haar medeauteurs gaan in op de mogelijke alternatieven binnen REACH. Zij constateren dat waar het 7<sup>e</sup> amendement voor cosmeticaproeven op den duur zal resulteren in een totaal verbod op dierproeven voor deze doeleinden, het REACH programma juist tot een grote toename van dierproeven zal leiden vanwege het grote aantal te testen stoffen. Evenals Ineke Gubbels stellen de auteurs dat REACH ook veel mogelijkheden voor een vernieuwde inzet van alternatieven biedt. Zij gaan vooral in op het gebruik van *in vitro* proeven om *in vivo* effecten te voorspellen. Beleidsmatig zijn er veel obstakels. Ook als *in vitro* proeven aantonen dat een stof *in vivo* zeer waarschijnlijk niet toxisch is, moet dit toch nog met dierproeven worden bevestigd. De auteurs pleiten voor het vaststellen van domeinen waarbinnen *in vitro* gegevens door de regelgeving geaccepteerd worden.

Ondanks de vele initiatieven en stimulerende ontwikkelingen voor de ontwikkeling van alternatieven in Europa werpt datzelfde Europa ook grote hindernissen op als het gaat om vermindering van proefdiergebruik. Pleun Honig laat zien dat de regelgeving in de EU zo bureaucratisch is dat daardoor het aantal dierproeven eerder toe- dan afneemt. Bij de toelating van een stof op de markt worden vaak allerlei veiligheidsgaranties gevraagd die dierproeven vereisen. Daarbij treden bureaucratische mechanismen op. Bestaande gegevens worden niet gebruikt omdat de regelgeving veranderd is, er is tegenwerking bij overheden voor de acceptatie van resultaten die niet met dierproeven zijn verkregen en stoffen moeten op verschillende manieren worden getest, vaak met proefdieren door het ontbreken van wederzijdse internationale erkenningen. Pleun Honig pleit daarom voor verdergaande internationale harmonisatie van de regelgeving.

## **Conclusies**

### ***Waarom alternatieven?***

Het streven naar alternatieven voor dierproeven heeft in de afgelopen 30 jaar haar vertaling gekregen in de drie V's: vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. Vervanging van dierproeven door dierproefvrije methoden is weliswaar de meest radicale V maar Frans Stafleu laat zien dat

daar ook een minder radicale variant van bestaat namelijk de vervanging van de ene diersoort door de andere diersoort. Indien dit op grond van minder ongerief plaats vindt, zou men dit ook als ook een vorm van verfijning kunnen beschouwen. Stafleu betoogt echter ook dat sociale dieren, dieren die met mensen een band kunnen ontwikkelen, vervangen zouden moeten worden door dieren die dat niet doen omdat die band wordt gebruuskeerd. Hiermee introduceert hij feitelijk een nieuwe grond voor alternatieven welke tot nu toe vooral gebaseerd is op het begrip ongerief. Ongerief en aantasting van de intrinsieke waarde zijn op dit moment echter de belangrijkste bezwaren tegen dierproeven en ook verankerd in de regelgeving. In hoeverre de door Stafleu voorgestelde uitbreiding gewenst en haalbaar is, zou verder onderwerp van studie moeten zijn; zijn voorstel zet wel aan tot denken.

### *Een vierde V?*

De ontwikkeling van geneesmiddelen en/of vaccins drijft nog grotendeels op dierproeven alhoewel daar, zoals Coenraad Hendriksen en Gerrit-Jan Wennink laten zien, indrukwekkende vervangingen en verminderingen zijn bewerkstelligd. Het is echter de vraag of met vervanging, vermindering en verfijning alle mogelijkheden voor alternatieven zijn benut. De suggestie van Frank Wassenberg om een vierde V van voorkomen na te streven is daarom interessant. De V van voorkomen refereert naar het doel van onderzoek in plaats van naar de vraagstelling en proefopzet waar de overige V's vooral betrekking op hebben. Het is bijvoorbeeld de vraag of alle testroutines, zie bijvoorbeeld het artikel van Pleun Honig, wel nodig zijn.

Goed beleid kan dus wellicht dierproeven voorkomen. Dit is zelfs nog algemener te trekken. Belangrijke ziekten in onze samenleving hebben betrekking op leefstijlen van mensen. Bekende voorbeelden zijn diabetes type II als gevolg van overmatig eten en weinig beweging, schade door roken en luchtvervuiling, enzovoort. Maatregelen in deze geheel andere beleidsvelden kunnen een effect hebben op het aantal dierproeven door een verminderde incidentie of ernst van deze ziekten en daarmee op de vraag naar dierproeven. In de artikelen in deze bundel zijn echter ook al voorbeelden van de V van Voorkomen te vinden. Zo laten Willem Schoonen en Jean Horbach zien dat met de opsporing van humaan toxische geneesmiddelen met behulp van alternatieven dierproeven kunnen voorkomen. De door Jan Vorstenbosch voorgestelde definitie van alternatieven zou wellicht in deze zin moeten worden aangepast.

## *Beleid*

De wettelijke inbedding van alternatieven voor dierproeven kent, zo blijkt uit de bijdrage van Bob van den Bos, een lange voorgeschiedenis. Ook in deze tijd gaat het nog uiterst traag. Beperkte financiering van onderzoek naar alternatieven, conflicterende en soms remmende regelgeving zijn hier ondermeer debet aan. Ook uit de andere bijdragen blijkt dat beleid uitermate belangrijk is. Met name het Europese beleid in het kader van REACH om 30.000 stoffen op hun veiligheid voor de mens te testen vormt zoals Sandra Coecke en haar collega's laten zien een grote uitdaging voor de ontwikkeling van alternatieven omdat het om miljoenen dieren zal gaan die in testen betrokken kunnen raken. Weliswaar betogen Ineke Gubbels en Cyrille Krul en haar collega's dat dit ook een stimulans kan betekenen voor de ontwikkeling van alternatieven, beleidsmatig moet dat dan wel een vertaling krijgen. Ook uit het artikel van Geny Groothuis en Jan van der Valk blijkt het belang van met name internationaal beleid. Humaan weefsel vormt een belangrijke potentiële bron voor alternatieven, maar de belangrijkste obstakels liggen in de logistiek en bij ethische vragen omtrent het verkrijgen van weefsel.

Beleid is echter niet alleen van de politiek afhankelijk. De steun van betrokkenen en van het publiek zijn daarvoor nodig. Dat zijn niet alleen de wetenschappers, biotechnici en dierenbeschermers. Belangrijk zijn ook patiëntenorganisaties die de patiënt, een belangrijke eindgebruiker van de met dierproeven verworven kennis, vertegenwoordigen. Het oplossen of verkleinen van het door Iris Arendzen genoemde duivelse dilemma tussen het belang van dieren en dat van mensen kan daarom niet om de positie van patiënten heen. Cees Smit laat zien dat de bereidheid van patiëntenorganisaties mee te denken hoe dilemma aan te pakken, zeker bestaat. Honderd procent lukt niet.

## *Rol onderzoekers*

Vrijwel alle auteurs stellen dat dierproeven voorlopig niet kunnen worden voorkomen maar dat winst zeker mogelijk is. Helaas is de ontwikkeling van alternatieven zelf een traag proces. De opkomst van genomics zo blijkt uit de bijdrage van Marjolein van Boxel biedt waarschijnlijk veel mogelijkheden maar de ontwikkeling en de acceptatie ervan nemen veel tijd en kunnen aanvankelijk ook tot extra dierproeven leiden. Dat geldt ook voor en computerondersteunende methodieken. Validatie van nieuwe methoden is belangrijk omdat de veiligheid van mensen voor vrijwel iedereen voorop staat. De

suggestie van Lars Ridder om adaptief, via voortdurende terugkoppeling, alternatieven te valideren en toe te passen is daarom belangrijk.

Verder is het belangrijk dat onderzoekers gebruik maken van bestaande kennis over en ervaring met alternatieven voor dierproeven. Publiek toegankelijke databases, zie ook de bijdrage van Theo Bakker, zijn daarbij wellicht een belangrijk hulpmiddel en zouden meer aandacht moeten krijgen bij researchprojecten. Voorwaarde is echter dat onderzoekers en biotechnici bereid zijn en de vaardigheid bezitten om alternatieven in te zetten. Alternatieven voor dierproeven dienen daarom ook in het onderwijs een plaats te hebben. René Remie en Jan van der Valk laten zien dat dit enerzijds betekent dat dierproeven in het onderwijs beperkt moeten worden maar dat anderzijds dierproeven voor studenten die dat aangaat, onontbeerlijk zijn.

Tenslotte, de vraag die in deze bundel wordt gesteld: 'Kan het ook anders?', kan zeker positief beantwoord worden maar tegelijkertijd is het duidelijk dat er door veel partijen nog veel werk moet worden verzet.

### **Geraadpleegde literatuur**

- Balls M. (1994) Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Laboratorium Animals* 28, 193-211.
- Balls M. (1996) Rex Leonard Burch (1926-1996) Humane Scientist, Prophet, Dreamer, Visionary. *Animal Welfare Information Center Newsletter*, 7(2) (<http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v7n2/7n2burch.htm>)
- Festing & Greek, (2003) Animal research. Necessary evil ... or both? *The ecologist*, November: 28-31.
- Greek C.R. & Greek J.S. (2002) Response to Dr. Festing's review of Sacred Cows and Golden Geese: The Human Cost of Experiments on Animals. (<http://www.curedisease.com/resources.html>)
- Jukes N. & Chiuiua M. (2003) *From Guinea Pig to Computer Mouse - Alternative methods for a progressive, humane education*. Second revised and expanded edition, Leicester: InterNICHE (<http://www.interniche.org>)
- Nuffield Council on Bio-ethics (2005) *The ethics of research involving animals*. The Nuffield Council on Bioethics: Londen (<http://www.nuffieldbioethics.org>)
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L., (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959.

# Over de geschiedenis en de betekenis van de term alternatieven

*Jan Vorstenbosch*

“Hij werd geboren in een alternatief gezinnetje: papa, mama en ook een alternatief vriendinnetje”. Het is de beginzin van het liedje ‘Alternatief’ van de Vlaamse zanger Miel Cools. We hebben het over de jaren zeventig, de jaren van het begrip tegencultuur, de jaren waarin vooral bij jongeren uit de hogere klasse het idee had postgevat dat de politieke en institutionele structuren op de schop moesten. Het revolutionaire elan van die jaren is na 25 jaar behoorlijk verdampt en veel van de toenmalige experimenten (communes, partnerruil, vrouwencafés) wekken nu eerder de lachlust dan interesse op. Maar het woord alternatief (alternatieve kleding, alternatieve leefstijl) is gebleven en heeft zelfs iets van zijn revolterende en radicale klank behouden. De maatschappelijke kritiek op het gebruik van dieren vormt in deze geschiedenis een interessant hoofdstuk omdat de term alternatieven in de huidige dierproevenpraktijk een centrale plaats inneemt.

In deze bijdrage wil ik op de eerste plaats de enigszins paradoxale ontwikkeling beschrijven die de term alternatieven heeft doorgemaakt, vooral in het verband met het concept van de drie V’s. Dit concept vat het appèl samen dat dierproeven, waar mogelijk, vervangen en verfijnd moeten worden met het oog op terugdringing van dierenleed en dat het aantal dieren verminderd moet worden. De term alternatieven heeft echter ook een soms verwarrend veld van verwijzingen en betekenissen gekregen. Ik probeer daar enige klaarheid in te brengen om te eindigen met een korte beschouwing over enkele belangrijke betekenissen van de term. Die betekenissen moeten in het oog worden gehouden, als men niet, zoals sommigen voorstaan, de term wil afschaffen ten faveure van het concept van de drie V’s.

## **De oorsprong van de notie van alternatieven voor dierproeven**

In november 2005 verscheen een speciaal nummer van het tijdschrift ‘Animal Welfare’. Hierin blikt Ken Russell, een van de auteurs van het baanbrekende werk ‘The principles of humane experimental technique’ (Russell & Burch, 1959) terug op de geschiedenis van de drie V’s (Russell, 2005). Hij constateert dat dit boek, waarvan de schrijvers beoogden dat het nadruk-

kelijk een praktische betekenis voor het ontwerp en de uitvoering van dierexperimenten zou hebben, in de eerste twintig jaar na verschijning nauwelijks gehoor vond. In 1978 kwam daar verandering in met de verschijning van het boek van David Smyth: 'Alternatives to Animal Experiments' (Smyth, 1978). Smyth zocht nadrukkelijk aansluiting bij de drie V's van Russell & Burch, maar zijn 'vertaling' van de drie V's in de term alternatieven viel bij het grote publiek duidelijk meer in de smaak. Het is alleszins waarschijnlijk dat twee factoren daarbij een rol speelden. Allereerst de evident politieke en radicale associaties die de term alternatieven in de loop van de jaren zestig en zeventig had gekregen. Dit in tegenstelling tot de drie V's die tot dan toe vooral een affaire van de wetenschappers zelf waren gebleven. Zo was het ook bedoeld door Russell & Burch. Het beroep dat ze met de drie V's deden gold wetenschappers die hun bestaande praktijk moreel zouden moeten verbeteren. Het begrip alternatieven politiseerde de discussie rond dierproeven en verbond het met een algemene kritiek op de gevestigde politieke en culturele instituties en praktijken. Deze politisering kon voortbouwen, en dat is de tweede factor, op de radicale kritiek die de Australische filosoof Peter Singer in zijn boek 'Animal Liberation' had geformuleerd op de manier waarop in het Westen met dieren werd omgegaan (Singer, 1975). De titel van dat boek legt expliciet de verbinding tussen het lot van dieren en de bevrijding van slaven, van vrouwen en andere onderdrukte groepen. Singer leverde met deze vergelijking argumenten die radicalere groepen het initiatief gaven, ten koste van de dierenbeschermingsbeweging die tot dan toe vooral uit burgers bestond afkomstig uit de gematigde middenklasse. Smyth behoorde overigens niet zelf tot deze radicalen. Hij was een belangrijk wetenschapper die een in vitro-methode had ontwikkeld. Wel bevatte zijn boek nogal wat, naar later bleek onterechte, twijfels over de mogelijkheden om met behulp van computertechnieken en weefselculturen, dierproeven terug te dringen. Indirect droeg hij met dit 'technologisch' pessimisme bij aan de zaak van hen die riepen om een meer radicale kritiek op dierproeven.

Sinds de publicatie van het boek van Smyth is de term alternatieven inzet van een breed gevoerde discussie over de ethiek van dierproeven. In de jaren tachtig en negentig kreeg het onderzoek naar en de invoering van vervangings-, verfijnings- en verminderingstechnieken financiële en institutionele ondersteuning (zie ook de bijdrage van Van der Bos in deze bundel). Men kan zich niet aan de indruk onttrekken dat dit iets te maken had met de maatschappelijke druk van de dierenbescherming op de politiek en

de wetenschap, en met de dreiging die van het meer radicale concept van alternatieven uitging voor de gevestigde wetenschap. Teruggrijpend op het oorspronkelijke werk van Russell & Burch ontwikkelde zich nu een brede interesse voor het vinden van alternatieven voor het gebruik van dieren in wetenschappelijke experimenten die zijn neerslag vond in de oprichting van nationale en Europese instituties en samenwerkingsverbanden. *In vitro* toxicologie, proefdierkunde en andere specialismen boekten successen en maakten het centrale argument van Russell & Burch waar dat humane experimenten en wetenschappelijk verantwoorde experimenten verenigbaar zijn. Sterker gezegd, inhumane experimenten zijn wetenschappelijk waardeloos, bijvoorbeeld omdat sterk gestresste dieren zeer instabiele en daarom onbetrouwbare meetresultaten opleveren. Men kan deze verwetenschappelijking van het alternatieven-concept zien als een compromis tussen wetenschap en samenleving, naarstig gesteund door de politiek die, als altijd, geïnteresseerd was in het verzoenen van maatschappelijke spanningen.

Een dergelijke verzoeningspoging blijft echter wringen. Critici van dierproeven zijn er niet gelukkig mee omdat ze vrezen dat er niet meer serieus gekeken wordt naar de onderliggende motivatie en de omvattende rechtvaardiging van dierexperimenten. Door de term alternatieven *de facto* te beperken tot de drie V's worden de scherpe kantjes van het doen van dierproeven afgehaald. De werkelijke morele problematiek schuilt volgens hen in het feit dat op kosten van dieren nogal eens onbetekenende menselijke belangen en soms ronduit egoïstische doelen worden nagestreefd. Het morele probleem is het sterk instrumentele gebruik van dieren, dat soms, paradoxaal genoeg, nog versterkt wordt door 'verfijning', zoals bij het steeds efficiëntere, pijnloze doden van dieren. Maar ook de drie V's specialisten zijn met de term alternatieven als omschrijving van hun activiteiten vaak niet erg gelukkig, omdat de term suggereert dat alleen vervanging beoogd wordt (Goldberg, 2004). Russell merkt dan ook op dat hij tot zijn genoegen heeft geconstateerd dat de verwarrende term alternatieven, die hij en Burch in hun boek nergens gebruiken, op zijn retour is (Russell, 2005). Het valt te bezien, bijvoorbeeld naar aanleiding van de beschouwingen in deze bundel, of die tendens inderdaad zo sterk is. Het zal bijvoorbeeld niet zo gemakkelijk zijn om de term uit de wetsteksten waarin zij thans figureert, te schrappen. Mijn stelling is dat het onwenselijk is dat deze verheldering wordt verkregen tegen de prijs van het uitbannen van de term alternatieven in wetenschappelijke en maatschappelijke discussies over het nut, het belang



en de zin van het wetenschappelijke gebruik van dieren. Maar om deze stelling op zijn waarde te schatten moeten we eerst deze geschiedenis van het gebruik van de term alternatieven aanvullen met een meer systematische beschouwing over de betekenis van alternatieven.

### **Drie betekenissen van alternatief**

In de ‘jaren zeventig’ betekenis van ‘alternatief’ die vooral ook in bijvoeglijke zin gebruikt wordt (alternatieve kleding, alternatieve leefstijl, ‘alto’s’) staat ‘alternatief’ voor een min of meer radicale afwijzing van een gevestigde, traditionele praktijk, stijl of structuur. Dat is bijvoorbeeld het geval bij de alternatieve geneeskunde. Een dergelijke alternatieve praktijk steunt vaak op heel andere uitgangspunten, principes en inzichten dan de ‘reguliere’ of ‘gevestigde’ geneeskunde. Ik noem dit de *structurele* betekenis van alternatief. De andere principes hoeven overigens niet per se moreel van aard te zijn, alhoewel ze soms op een ondoorzichtige manier met morele motieven verbonden kunnen zijn. Mensen die hun heil zoeken bij de alternatieve geneeskunde, zoals homeopathie, hebben niet per se morele bezwaren tegen de reguliere geneeskunde. Zij ‘geloven’ er alleen minder in bijvoorbeeld vanwege de reductionistische benadering in de reguliere geneeskunde. Soms zijn er echter ook meer morele bezwaren zoals de ‘onpersoonlijke’ behandeling van patiënten in de reguliere geneeskunde.

Men kan echter ook de betekenis van ‘alternatief’ in deze structurele zin beperken tot het zoeken en verdedigen van alternatieve benaderingen die aan een bepaalde morele voorwaarde voldoen, zoals bijvoorbeeld het niet gebruiken van dieren omdat het ‘sentient beings’ zijn, die pijn kunnen lijden. Ook dit is in tal van betekenisverbanden een gewone betekenis van de term ‘alternatief’, die echter vaak impliciet blijft omdat de morele norm niet ter discussie staat. Ik geef een voorbeeld. Een groep toeristen heeft een uitstapje gepland. Een van hen zit in een rolstoel. Iemand stelt voor om naar een bepaald museum te gaan, maar daar blijkt geen toegang te zijn voor rolstoelen. Dit plan valt af, want niemand wil de rolstoeler uitsluiten. Iemand vraagt: “Is er een alternatief?” zonder verder door te gaan op de morele kanten van de keuzesituatie waarin men terecht is gekomen. Het is dan echter al wel duidelijk dat elke keuze voor een gelegenheid waar de rolstoeler geen toegang heeft, niet in aanmerking komt. Alternatieven kunnen dus soms hun betekenisinhoud krijgen tegen een bepaalde normatieve achtergrond, in een specifieke context. Ze hoeven niet altijd een

radicale en omvattende kritiek te impliceren.<sup>1</sup> Ik noem dit de *morele* betekenis van ‘alternatief’.

De positie van een organisatie als ‘Proefdiervrij’ is in dit verband interessant (zie ook de bijdrage van Frank Wassenberg in deze bundel). Aan de ene kant lijkt me deze positie een duidelijk voorbeeld van de morele invulling van alternatieven. Aan de andere kant worden door de organisatie soms argumenten gebruikt die veel meer met de eerste betekenis gemeen hebben, zoals het argument dat de meeste dierproeven geen werkelijk wetenschappelijk inzicht opleveren of dat juist door dierproefvrije wetenschap de creativiteit wordt gestimuleerd en de wetenschap verder komt.<sup>2</sup> Het gaat er mij niet om of deze argumenten steekhoudend zijn.<sup>3</sup> Het gaat er mij om dat het onderscheiden van de verschillende argumenten die met beide betekenissen van alternatieven verbonden zijn, de discussie ten goede zou komen. Met name ook omdat voor de ethiek van dierproeven het expliciteren van de reële ‘kosten’ die met een dierproefvrij alternatief verbonden zijn, belangrijk is. Die kosten kunnen financieel van aard zijn, maar ook betrekking hebben op de risicomarges die we voor mensen accepteren. Bovendien kan de erkenning van de morele betekenis van het gebruik van wezens met ervaringsvermogen zoals dieren, een belangrijk gedeeld uitgangspunt zijn van zowel wetenschappers als critici. Het kan het zoeken naar alternatieven tot een gemeenschappelijk project maken. Dit is een niet te verwaarlozen praktische en politieke basis voor het bevorderen van onderzoek en invoering van dierproefvrije alternatieven.

Tenslotte is er een derde betekenis van het begrip ‘alternatief’ dat meer in zelfstandige naamwoordconstructies (‘een alternatief’) voorkomt en in het gebruik een heel andere betekenisomgeving vooronderstelt. Die omgeving is er een waarin de handelende persoon wel een doel of wens heeft, zonder dat die al omgeven is met meer of minder radicale normatieve voorwaarden. Er is sprake van een min of meer open overlegsituatie waarin nog allerlei overwegingen mee kunnen gaan doen voordat de uiteindelijke keuze gemaakt wordt. Mijn vrouw en ik willen naar de bioscoop, kijken elkaar aan en vragen ons af wat zijn de keuzemogelijkheden, de handelingsopties,

- 1 Merk op dat in het voorbeeld de groep in principe ook alles in het werk had kunnen stellen om de museumorganisatie te bewegen voor hun groepslid extra voorzieningen te scheppen.
- 2 Op dit punt vertoont de positie van Proefdiervrij een zekere verwantschap met die van de strikte, wetenschappelijke invulling van alternatieven. Ook Russell & Burch verdedigden een ‘convergentie’-argument: humane wetenschap is goede wetenschap.
- 3 Ik denk dat ze dat soms zeker zijn, maar soms ook niet.

de alternatieven, niet voor bioscoopbezoek, maar met betrekking tot de vraag welke films er draaien. ‘Alternatief’ heeft hier de veel neutralere en alledaagse betekenis van (handelings)optie die in het licht van bepaalde redenen gewogen kan worden. We kunnen met de auto en we kunnen met de fiets naar het werk gaan. In deze zin is het begrip sterk verbonden met rationele overwegingen of redenen (voor- en nadelen, kosten, wensen) waarbij iemand een bepaald handelingsalternatief als beste zal selecteren.

Interessant is dat Russell & Burch het begrip ook in deze betekenis niet gebruiken. Dat heeft mijns inziens te maken met het feit dat hun boek sterk is geschreven vanuit een wetenschappelijk perspectief. Hun belangrijkste argument in het pleidooi voor ‘humane’ dierexperimenten is dat dergelijke experimenten ook wetenschappelijk veel meer waarde hebben. Hun boek gaat grotendeels over strategieën, mogelijkheden, instrumenten, onderzoeksparadigma’s etc. die het lijden van dieren elimineren of beperken én de wetenschap vooruit helpen. Waar het om gaat is dat wetenschappers, want tot hen is het boek vooral gericht, zich een bepaalde ‘houding’ eigen maken, namelijk een houding waarin systematisch gezocht wordt naar de situatie waar maximale zorg voor het dier en maximale wetenschappelijke kwaliteit samengaan. Terwijl alternatieven, in de radicale ‘jaren zeventig’ betekenis, maar ook in de neutrale, alledaagse betekenis van ‘meerdere dingen kunnen doen’, zijn geassocieerd met een respectievelijk radicale dan wel rationele *keuze*, waaraan meestal ook kosten verbonden zijn, leggen Russell & Burch veel meer de nadruk op de win-win-aspecten van een humane benadering van dierexperimenten.<sup>4</sup>

Ik heb het idee dat de rationele alternatievenbetekenis voor Russell & Burch niet echt leeft omdat zij twee dingen vooronderstellen. Ten eerste dat er binnen de wetenschappelijke praktijk geen werkelijke keuzes liggen ten aanzien van een vraagstelling en de daarvoor geëigende methode om haar te beantwoorden.<sup>5</sup> Ten tweede omdat hun perspectief zich niet leent

4 Men kan dit natuurlijk kwalificeren als een rationele keuze, maar dan vanuit een specifiek wetenschappelijk perspectief en niet vanuit een inclusief perspectief waarin ook andere redenen kunnen tellen zoals het budget dat beschikbaar is. Waar het omgaat is dat in de benadering van Russell en Burch (moreel gekleurde) keuzes kunnen worden gemaakt waarin het wetenschappelijk alternatief (voldoende of geheel) convergeert met een moreel alternatief. De wetenschapper committeert zich in dit geval aan zowel wetenschappelijke als morele waarden.

5 Dat dit geen jaren vijftig opvatting is van de eenduidigheid van wetenschappelijke vraagstelling, blijkt misschien uit het volgende citaat uit het eerder aangehaalde artikel van Russell in het speciale nummer van *Animal Welfare* over de drie V’s. ‘... it is ridiculous to apply the term ‘alternative’ to good experimental design and analysis, because the only alternative is bad design and analysis’. Ik vraag me sterk af of experimenteel onderzoek aan een dergelijk dichotomisch oordeelsschema (alles of niks, goed of slecht) kan worden onderworpen.

voor een afweging van alternatieven in het licht van een breder spectrum van overwegingen dan puur wetenschappelijke. Het kan echter wel dege-lijk een kwestie van rationele keuze zijn om vanwege financiële, morele dan wel politieke redenen in te leveren op een *maximale* wetenschappelijke kwaliteit. Dat is mijns inziens zelfs relatief vaak het geval, bijvoorbeeld omdat wetenschappelijk onderzoek nu eenmaal geld kost. Het kan bijna geen toeval zijn dat voor veel blootstellingsexperimenten met paarden met twee of vier dieren volstaan wordt, terwijl het bij kippen zelden om minder dan 20 en vaak om zeer grote aantallen gaat. Zo veel ingewikkelder zijn paarden nou ook weer niet dan kippen.

### **Naar een open werkdefinitie van alternatieven**

Het kan zeker zinvol zijn om bij concrete discussies over dierexperimenten de verschillende betekenissen die in het spel kunnen zijn, in gedachten te houden. Voor een aantal contexten, zoals de institutionele en de juridische, zou het echter te complex en onuitvoerbaar zijn om bij een definitie van alternatieven aan alle drie de betekenissen recht te doen. Ik denk dat wets-teksten en de meeste praktische discussies de tweede morele betekenis als uitgangspunt nemen, en ook wel moeten nemen gegeven het feit dat dieren en hun vermogen om ervaringen te hebben, de morele sleutel tot de maatschappelijke kritiek op dierexperimenten vormen. Bij de daadwerkelijke uitwerking van deze betekenis van alternatieven voor dierproeven, zullen vervolgens ongetwijfeld de perspectieven van het eerste en derde betekenisveld een rol gaan spelen. De tweede betekenis bepaalt echter tot op grote hoogte de ruimte waarbinnen bijvoorbeeld in dierexperimentencommissies kan en zal worden gesproken. Het is daarom goed om te streven naar een werkdefinitie die qua woordkeuze, strekking en afbakening de morele interpretatie van alternatieven zo goed mogelijk weerspiegelt. Tot slot van dit artikel zal ik dat proberen te doen.<sup>6</sup> Ik zal me daarbij concentreren op drie belangrijke elementen in de regelingen van dierexperimenten en de drie V's: de notie van wetenschappelijke procedure, de betekenis van 'dieren' en de betekenis van alternatieven als een samenvattend begrip voor de drie V's.

6 Wat volgt is het resultaat van een aantal discussies die in het kader van een Europees project over de drie V's werden gevoerd door Italiaanse, Britse en Nederlandse onderzoekers, waaronder ondergetekende. Voor meer informatie zie: <http://www.inemm.cnr.it/animalsee/dis-seminations.html>

### *Experimenten en wetenschappelijke procedures*

De voor deze discussie bepalende tekst is die van de Europese Richtlijn uit 1986.<sup>7</sup> In deze richtlijn is sprake van ‘experiment’ als centrale term, maar deze benadering moet toch wel als te beperkt worden beschouwd. Sommig gebruik van dieren voor algemene, niet-veterinaire doelen die allerm minst experimenteel zijn, zoals het verkrijgen van ‘biologisch materiaal’ zijn duidelijk niet experimenteel, maar routinematig. In plaats van experiment is daarom het begrip wetenschappelijke procedure in gebruik geraakt. Ik sluit hiervoor aan bij een van de meer recente definities van ‘wetenschappelijke procedure’, welke is voorgesteld door de Technische Expert Werkgroep voor de Revisie van Richtlijn 86/609/EEC, subgroep ‘Scope’: Een wetenschappelijke procedure is volgens deze werkgroep *“Een combinatie van een of meer technische handelingen, uitgevoerd op een dier voor een experimenteel of ander wetenschappelijk doel, en die bij dat dier pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken”*.<sup>8</sup> Voorbeelden van dergelijke technieken zijn een injectie, het onthouden van voedsel en water, en chirurgische ingrepen. De voorbeelden suggereren dat technische handelingen beperkt zijn tot de procedure in strikte zin, maar in andere delen van het document is ook sprake van andere fasen en functies in het leven van een proefdier zoals het fokken en het huisvesten. Ik denk dat het belangrijk is voor de discussie over alternatieven de discussie niet te beperken tot alternatieven voor de procedure in strikte zin maar ook te kijken naar alternatieven voor huisvesting en andere handelingen met deze dieren. Dit zou kunnen worden bereikt door ‘technische’ in de definitie weg te laten. Het lijkt realistisch om te stellen dat alle handelingen en condities waaraan proefdieren worden onderworpen, uitgevoerd worden met het oog op en omwille van het wetenschappelijke doel. Om experimenten in het vrije veld en in de omgeving van het dier die het dier in zijn belangen kunnen raken, in te sluiten, zou naast ‘uitgevoerd op het dier’ vermeld kunnen worden: of ‘die gevolgen kunnen hebben voor een dier’. Een wetenschappelijke procedure is dan *“Een of meer handelingen die worden uitgevoerd op een dier of die gevolgen kunnen hebben voor een dier, ten behoeve van een experimen-*

7 Zie Council Directive 86/609/EEC On the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

8 Experimenten die in het vrije veld worden gedaan en meer de omgeving van het dier manipuleren, bijvoorbeeld door extra roofdieren uit te zetten, vallen strikt genomen niet onder deze definitie.

*teel of ander wetenschappelijk doel, en die bij dat dier pijn, lijden, angst of blijvende schade kunnen veroorzaken*". Het noemen van pijn en lijden laat zien dat de definitie is opgesteld met de bedoeling moreel relevante handelingen af te bakenen. Het inbrengen van 'kan' (dat wil zeggen: er is een risico dat ...) laat de definitie voldoende open om alle wetenschappelijke procedures met dieren te dekken, als we accepteren dat gevangenschap van proefdieren schade kan impliceren, en dat *de facto* ook vaak doet.

### ***Het bereik van alternatieven: ervaringsvermogen als een criterium***

Gewervelde dieren worden door de meeste mensen als wezens met ervaringsvermogen beschouwd. Zij komen in aanmerking voor morele bejegening vanwege hun vermogen om pijn en angst te lijden. Het feit dat veel dierproefvrije alternatieven met micro-organismen en ongewervelde dieren werken, geeft aan dat de groep van 'dieren', waar de Richtlijn op doelt, beperkt is tot 'dieren die plezier en pijn kunnen hebben'. In de Nederlandse Wet op de Dierproeven, die spreekt over gewervelde dieren, is dit expliciet gemaakt. Het lijkt daarom gerechtvaardigd om te veronderstellen dat de dieren waar we het bij het zoeken naar alternatieven over hebben, kunnen worden omschreven als "*voelende, niet-menselijke gewervelde dieren, en andere diersoorten die belangen en vermogens hebben die vergelijkbaar zijn met die van gewervelde dieren*". Er zijn vragen omtrent de status van foetale en embryonale vormen van gewervelde dieren. Daarover is nog weinig wetenschappelijke informatie beschikbaar. Om redenen van voorzorg, maar ook omwille van de mogelijkheid om de oorsprong van ongerief en het welzijn van proefdieren over hun hele leven te kunnen beoordelen, bijvoorbeeld in het geval van transgene dieren, is het beter om deze vormen in te sluiten, en het gebruik ervan te toetsen.

### ***Alternatieven***

Nu we het bereik van een definitie van alternatieven in tweeërlei zin hebben vastgesteld, namelijk de vraag waarvoor we alternatieven zoeken en de vraag wat als een alternatief in aanmerking komt (alles dat ervoor zorgt dat levende, ervarende wezens beter beschermd worden in hun belangen en ervaringen), is het zaak een definitie van alternatieven te geven. Veel landen hebben wettelijke regelingen die het gebruik van alternatieven, indien beschikbaar, verplicht stellen. Enkele problemen die er met deze verplichting kunnen rijzen, zagen we eerder al. Ten eerste wordt het begrip vaak zo verstaan dat alleen vervanging als alternatief wordt gezien, meer in het bij-

zonder complete vervanging. Dit laat geen ruimte voor de moreel alleszins wenselijke vervanging van dieren met een hogere neurofysiologische gevoeligheid door dieren met een lagere gevoeligheid en voor het reduceren van aantallen gebruikte dieren en het verfijnen van dierexperimenten.

Ten tweede wordt het begrip alternatieven vaak incompleet gebruikt door weglating van een antwoord op de vraag: alternatief voor wat? Een alternatief kan een zeer specifiek alternatief zijn voor een enkelvoudig voorgesteld dierexperiment, het kan een alternatief zijn voor een bepaalde methode, procedure of conditie voor een dierexperiment welke met een zekere regelmaat terugkeert, bijvoorbeeld het afnemen van bloed via staartpunctie of orbitaal (uit de oogbal). Het kan ook een alternatieve strategie of benadering zijn voor een wetenschappelijke, beleidsmatige of technische vraag die het experiment of het project in eerste instantie heeft gemotiveerd.

Een derde probleem is dat alternatief vaak expliciet of impliciet wordt begrepen in verwijzing naar een bestaande, in gebruik zijnde praktijk of methode. Deze betekenis die ik eerder analyseerde kan een positieve of een negatieve bijklank hebben, al naargelang iemands positie: conservatief (“Wat al zo lang bestaat, zal zijn waarde wel bewezen hebben”) of radicaal (“Sterft, gij oude vormen en gedachten”). Vaak staat deze betekenis een open en redelijke discussie over de gebruikte methoden en een alternatief daarvoor in de weg.

Gezien deze misverstanden verdient het aanbeveling om redenen van helderheid, in discussie zo veel mogelijk te refereren naar: a) vervangings-, verfijnings- en verminderingsalternatief en niet naar alternatieven in het algemeen, en b) de term te gebruiken in een bijvoeglijke zin die de beoogde gang van zaken zo expliciet mogelijk benoemt en omschrijft, zoals in ‘Een alternatieve benadering voor het probleem dat dit dierexperiment motiveert, is te kijken naar andere wetenschappelijke of beleidsmatige manieren om met het probleem om te gaan’. Ondanks deze adviezen voor het gebruik van de term in discussies en beraadslagingen, zal het begrip alternatieven wel gebruikt blijven worden om de drie V's samen te vatten. Een acceptabele definitie blijft daarom wenselijk. De definitie die ik voorstel luidt:

*Een ‘alternatief’ voor een dierexperiment is elke procedure – dat is: elke methode, techniek of benadering en elk voorstel – die bedoeld is om een op wetenschappelijke grondslag georganiseerde handeling of reeks van handelingen die de belangen van dieren kan schaden, te vervangen, dan wel het aantal benodigde dieren te verminderen, of de*

*handeling te verfijnen op zo'n manier dat het welzijn van de betrokken dieren wordt verbeterd.*

Deze definitie dekt alle drie de V's, is in de breedst mogelijke zin gerelateerd aan het idee van alternatieven, en sluit alle relevante elementen en opties in die in aanmerking komen voor verdere uitwerking en discussie. Zij sluit ook geen kwesties uit die vanuit moreel perspectief relevant zijn voor de beoordeling van dierexperimenten.

## **Literatuur**

- Goldberg A.M. (2004) Animals and alternatives: societal expectations and scientific need, ATLA 32: 541 – 551.
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959.
- Russell W.M.S. (2005) The Three Rs: past present and future, Animal Welfare, 14: 279 – 286
- Smyth D. (1978) Alternatives to Animal Experiments, London: Scolar Press.
- Fretz L. & J. Vorstenbosch (1994) Reel, rationeel en redelijk. Een onderzoek naar normatieve vragen rond alternatieven voor transgenese bij dieren, Rapport in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Den Haag, juli 1994.
- Vorstenbosch J.M.G. (2005), The ethics of the Three Rs principle: a reconsideration, Animal welfare 14: 339 – 446.



# Het dier als alternatief bij dierproeven

*Frans Stafleu*

Dieren worden gebruikt voor dierproeven, maar er zijn vele soorten dieren en de vraag rijst daarom welk dier je gebruikt. De keuze van het juiste proefdier wordt voor een groot deel bepaald door technische overwegingen. Ten eerste moet het dier geschikt zijn voor het onderzoek. Om een zeer eenvoudig voorbeeld te noemen: een onderzoek naar de galblaas met gebruik van ratten ligt minder voor de hand want ratten hebben geen galblaas. Maar ook de vraag of je met een bepaalde diersoort een goed “model” voor de mens kunt maken bepaalt vaak de diersoort. Apen zijn nu eenmaal de enige dieren die geïnfecteerd kunnen worden met het HIV-virus. Daarnaast spelen economische overwegingen een rol: het houden van ratten en muizen is veel goedkoper dan van een aap of een paard. Ook hebben zich in de loop van de tijd tradities ontwikkeld om bepaalde dieren voor bepaalde doeleinden te gebruiken. Zo worden bijvoorbeeld cavia's gebruikt voor onderzoek aan het binnenoor en katten voor neurologisch onderzoek van het zien. Deze tradities hebben waarschijnlijk hun oorsprong in technische overwegingen. Maar, ook al zouden deze technische overwegingen in deze tijd niet meer gelden, dan nog is alle beschikbare informatie geënt op de traditionele diersoorten en zijn onderzoekers geneigd deze te blijven gebruiken. Tot zover een korte impressie van de proefdierkundige technische redenen om voor een bepaalde diersoort te kiezen. De ervaring leert dat deze overwegingen veelal de doorslag geven bij de keuze van het proefdier.

In dit essay zal ik de vraag behandelen of de keuze voor een ander dier (bijvoorbeeld een rat gebruiken in plaats van een aap) kan gelden als alternatief voor een dierproef en daarbij komen ook ethische overwegingen om de hoek kijken.

## **De keuze voor een andere diersoort als alternatief**

In de proefdierkunde noemen we iets een alternatief als de nieuw gekozen handelswijze op zijn minst een moreel voordeel oplevert ten aanzien van de oorspronkelijk voorgenomen of gebruikelijke wijze van uitvoering van de proef (zie ook de bijdrage van Jan Vorstenbosch). Het te behalen more-

le voordeel wordt in de praktijk verwoord door het in acht nemen van de “drie V’s”: de vermindering van het aantal dierproeven, de verfijning van de proef zodat het dier er minder last van heeft of de vervanging van een experiment door een dierproefvrije versie zodat er geen dier is dat er last van heeft. In eerste instantie lijkt de vraag of een andere diersoort een moreel voordeel oplevert daarom af te hangen van de vraag of het bijdraagt aan de verwerkelijking van de drie V’s. Maar wellicht zijn niet alle morele aspecten gevangen in de praktische vertaling naar de drie V’s. Daarom wil ik één stapje terug doen en op een fundamenteeler niveau kijken naar het morele voordeel een andere diersoort als alternatief kan opleveren. Dit doe ik dus om vanuit een fundamenteel/theoretisch ethisch oogpunt preciezer te kunnen aangeven waar het eventuele morele voordeel van een andere diersoortkeuze vandaan komt. Ik zal hierbij redeneren vanuit ethische theorieën. Zie ook de bijdrage van Swart in het vorige deeltje van deze reeks (Swart 2004) die de problematiek benaderd vanuit vier veel gebruikte principes.

### **Redeneren vanuit utilistische theorieën**

Laten we beginnen met het klassieke bezwaar tegen dierproeven namelijk het feit dat dieren door de proeven kunnen lijden en dat lijden slecht is. Dit sluit aan bij één van de klassieke ethische theorieën namelijk het utilisme. De basisvorm van het utilisme houdt in dat hetgeen van waarde is in deze wereld uiteindelijk terug te brengen is tot “geluk” en dat wij zo dienen te handelen dat een maximaal overwicht van “geluk” over “lijden” wordt gerealiseerd. Geluk moet hier niet worden geïnterpreteerd als alleen maar extase of hedonie, maar meer als een positieve ervaring van zich goed voelen, het gevoel hebben dat het goed gaat.<sup>1</sup> Bij het vaststellen van de balans tussen geluk en lijden is het belangrijk zich te realiseren dat het geluk en lijden van *alle* betrokkenen meetelt. Bij een dierproef betekent dat dus dat niet alleen gekeken moet worden naar het lijden van het proefdier, maar ook naar het geluk van bijvoorbeeld de mens die baat heeft bij het door dierproeven ontwikkelde medicijn.

Hoe valt nu in deze theorie er voordeel te behalen uit de keuze van een ander proefdier? Ten eerste zou het kunnen zijn dat een ander dier minder last heeft van de voorgenomen ingreep. Dit punt ligt ten grondslag aan het feit dat we in de Wet op de dierproeven (Wod) alleen maar rekening hou-

1 In de oorspronkelijke tekst van de bedenker van deze theorie stonden, geloof ik, 56 omschrijvingen van geluk, dus zo eenvoudig is dat allemaal niet!

den met gewervelde dieren. We gaan er, op grond van de bouw van het zenuwstelsel, vanuit dat ongewervelde dieren niet kunnen lijden en daarom tellen ze niet mee. Als we dus een proef met een slak kunnen doen in plaats van met een rat dan hebben we winst behaald want de totale hoeveelheid lijden die verbonden is met de proef, is sterk verminderd terwijl de opbrengst in geluk hetzelfde is gebleven. In het kader van de Wet is er niet eens meer sprake van een dierproef en hebben we aan “Vervanging” gedaan, want we hebben een proefdier vervangen door een “niet-proefdier”. Bovendien hebben we de hoeveelheid lijden verminderd en dat is een “Verfijning”.<sup>2</sup>

Maar we kunnen langs utilistische lijnen redenerend ook binnen de klasse van gewervelden blijven. We zouden kunnen redeneren dat bepaalde ingrepen voor de ene gewervelde diersoort meer lijden oplevert dan voor de andere. Een sociaal levend dier heeft meer last van individuele huisvesting dan een niet sociaal levend dier, dus als individuele huisvesting in het kader van de proef noodzakelijk is kun je beter een hamster gebruiken dan een rat. Een andere invalshoek zou kunnen zijn niet alleen naar de experimentele ingreep te kijken maar ook naar de huisvesting van de dieren. Ratten zijn bijvoorbeeld makkelijker zo te huisvesten dat aan hun welzijnsbehoefte wordt voldaan dan apen. De standaard huisvesting veroorzaakt dus bij apen al gauw meer lijden dan bij ratten. De keuze voor de rat ligt dan voor de hand.

Ook zouden we kunnen redeneren dat dieren die meer zelfbewustzijn hebben dan gemiddeld, denk hierbij aan primaten en dolfijnen, van dezelfde ingreep meer last hebben dan bijvoorbeeld minder bewuste dieren zoals een rat of een vis. De vraag is echter hoe een grotere mate van zelfbewustzijn er toe bij kan dragen dat een dier meer lijdt. Dit kan bijvoorbeeld door aan te voeren dat dieren die een groter bewustzijn hebben een rijker leven hebben en dat een beperking van dat leven intensiever aangrijpt bij dan dieren met een minder rijk leven het geval is. Maar ja, hoe meet je dat dan? Uit onderzoek in het kader van mijn proefschrift (Stafleu, 1994) bleek overigens dat als je aan twee groepen respondenten identieke proeven voorlegt die alleen qua proefdier, aap of rat, verschillen, er wel een onderscheid wordt gemaakt in de aanvaardbaarheid van die dierproeven maar niet in de inschatting van het lijden. Apen waren minder aanvaardbaar dan ratten, maar het lijden werd dus hetzelfde ingeschat. Blijkbaar hadden deze respondenten

2 Let wel: ik ga hier niet in op de vraag of de aanname dat ongewervelden niet kunnen lijden juist is en ik blijf binnen het Utilisme en kijk dus alleen naar de geluk-lijden rekening en dus niet naar zaken zoals “respect voor het dier” wat immers meer in een andere ethische theorie thuis hoort, zie later.

andere criteria dan de geluk-lijden balans van de experimentele ingreep voor hun beoordeling van de ethische toelaatbaarheid van de proeven.

Voordat we het utilisme verlaten als theorie om te beoordelen of het gebruik van een andere diersoort moreel voordeel oplevert, wil ik een gedachtesprong maken. Tot nog toe hebben we in de redeneringen alleen rekening gehouden met het verminderen van lijden bij de dieren, bij gelijkblijvend menselijk geluk. Maar wat nu als door het kiezen van een andere diersoort het dierlijk lijden gelijk blijft maar het menselijk geluk toe of afneemt? Het gaat immers om de balans tussen geluk en lijden van alle betrokkenen? Binnen de utilistische theorie is het antwoord eenvoudig: hoe de balans wordt bereikt is irrelevant, het gaat er om die handeling te kiezen die het grootst mogelijke overwicht van geluk over lijden geeft. Ik wil daarom terug naar de keuze tussen de aap en de rat uit mijn proefschrift zoals hierboven beschreven. Als het ongerief hetzelfde is voor de rat en de aap, welke reden zou er dan kunnen zijn om voor de rat te kiezen? Mijn antwoord is dat het gebruik van apen voor mensen in het algemeen meer belastend is dan het gebruik van ratten. Ik bedoel dit niet (alleen) in praktische zin maar vooral in emotionele zin. Wij identificeren ons meer met apen dan met ratten en dat zorgt ervoor dat het lijden van apen ons meer raakt dan dat van ratten, ook al zou dat lijden objectief hetzelfde zijn! Dit emotioneel geraakt worden telt ook als lijden. Bij gelijkblijvend dierlijk lijden is dit vermijden van menselijk lijden door het gebruik van ratten dan ook, althans binnen een utilistische theorie, goed te verdedigen. Eenzelfde redenering gaat op voor het gebruik van huisdieren als hond, kat, paard etc.

Samenvattend kunnen we zeggen dat de utilistische theorie vele aanknopingspunten geeft om door middel van de proefdierkeuze morele winst te behalen. Dit gebeurt in alle gevallen door te bezien of de gevolgen van de andere keuze morele winst oplevert voor de overall balans tussen geluk en lijden.

### **Redeneren vanuit deontologische theorieën**

Maar zou er vanuit een ander ethisch perspectief dan geluk en lijden morele winst te behalen zijn?

Hoewel er in het dagelijks leven veel utilistisch wordt geredeneerd en het door zijn relatieve eenvoud en helderheid een grote aantrekkingskracht heeft, zijn er ook nog andere ethische theorieën die niet (of niet alleen) de balans tussen geluk en lijden als richtinggevend aannemen. Deontologische theorieën gaan uit van de aard van de handeling en niet op de gevolgen van de handelingen. Ze komen vaak neer dat op “respect”, in ons geval respect

voor het dier. Nu is respect voor het dier moeilijk te combineren met dierproeven. Immers in dierproeven worden dieren *puur* als instrument gebruikt, en dit botst met een opvatting van respect in de zin van “respect voor de eigenheid of eigenwaarde van het dier”. Dit puur instrumentele karakter laat zich illustreren door het feit dat het vervangen van de proefdieren door niet dierlijke alternatieven door de meeste onderzoekers wordt geaccepteerd, tenminste als dezelfde onderzoeksdoelen kunnen worden behaald. Vergelijk dat maar eens met een melkveehouder waaraan je zou voorstellen melk zonder koeien via een bioreactor te gaan produceren. Hij zou waarschijnlijk zeggen “dan ben ik geen boer meer”. Het dier hoort in de melkveehouderij intrinsiek thuis. In de praktijk van de dierexperimenten is het echter een noodzakelijk kwaad. Het dier heeft als hinderlijke eigenschap dat het kan lijden en daarom moet het verminderen van lijden als randvoorwaarde worden genomen voor het uitvoeren van dierproeven, maar het dier zelf is louter een instrument. Respect voor dieren (in de zin van eigenheid of eigenwaarde) is daarom mijns inziens bij dierproeven een gepasseerd station, we hebben hoogstens respect voor hun lijden, maar verder niet.

Maar dit gezegd hebbend, zouden we toch kunnen kijken of respect een basis zou kunnen zijn om dieren verschillend te behandelen en zo moreel voordeel te behalen bij het kiezen van een andere diersoort. De meeste deontologische theorieën stellen dat we respect moeten hebben voor een entiteit indien deze onlosmakelijk verbonden is met de eigenschap die respect verdient. Bij Kant is het feit dat de mens een rationeel wezen is er de reden van dat de mens dient te worden gerespecteerd. Filosofen die deontologisch redeneren over onze verhouding met de dieren komen met eigenschappen als “zelfstandigheid, doelgerichtheid (*telos*) of *subject of life*. Deze eigenschappen zouden ons er toe nopen om respect voor het dier te hebben. In de praktijk betekent dat vaak dat we het dier zo veel mogelijk ongemoeid moeten laten: “handen af”.

Zoals gezegd lijkt dit bij dierexperimenten al een gepasseerd station. Maar wellicht is er toch nog voordeel te behalen. Want het feit dat de mens een bewust wezen is, leidt er toe dat veel mensen in afwegingen het belang van de mens prevaleren boven het belang van het dier. Bewustzijn verdient in deze visie respect en het rechtvaardigt een andere behandeling van mensen dan van dieren. Maar, als dat waar is dan zouden we moeten concluderen wezens die qua bewustzijn dicht bij de mens staan ook beschermwaardiger moeten zijn. Dat zou er een reden voor kunnen zijn om primaten en bijvoorbeeld dolfijnen te ontzien; immers er zijn goede aanwijzingen dat

deze wezens qua intelligentie en bewustzijn bij ons in de buurt komen. Overigens zou dat het gebruik voor proeven van koudbloedigen, die qua bewustzijn waarschijnlijk aan de andere kant van het gemiddelde zitten, aanmoedigen. Het aardige is dat dit precies is wat er in de praktijk gebeurt: proeven met mensapen zijn verboden in Nederland en de ervaring leert dat proeven met apen moeilijker liggen dan vergelijkbare proeven met ratten (zie boven de verwijzing naar mijn proefschrift). Koudbloedigen worden ook makkelijker gebruikt dan overige gewervelden.

Samenvattend kunnen we zeggen dat deontologische redeneringen minder goed te combineren zijn met de praktijk van dierproeven, maar dat als we bewustzijn als te respecteren eigenschap zien, er goede redenen zijn om apen en andere meer dan gemiddeld bewuste dieren te ontzien en bij voorkeur koudbloedigen te gebruiken.

### **Redeneren vanuit zorgethiek en relaties**

Als laatste wil ik de mogelijkheden bezien die er binnen de zorgethische benadering zijn om morele winst te behalen met een proefdierkeuze. Bij de zorgethische benadering wordt de nadruk gelegd op (zorg)relaties die mensen met elkaar hebben. Als mens heb je ten opzichte van medemensen waar je een speciale relatie mee hebt, andere plichten dan met hen die verder weg van je staan. Ten opzichte van je eigen kind heb je meer plichten dan ten opzichte van het buurkind bijvoorbeeld. Bij mens-dier relatie is dat vertaald (Swart, 2005) in de mate waarin een dier leeft in een omgeving die door de mens wordt bepaald. Bij gehouden dieren, die in een omgeving leven die voornamelijk door de mens wordt bepaald, zou dat betekenen dat je een grote “specifieke zorgplicht” hebt. Dat wil zeggen dat je als mens zorg moet dragen voor het welzijn van het individuele dier. Bij wilde dieren, die in een omgeving leven die veel minder of niet door de mens wordt bepaald, bestaat er “niet-specifieke zorgplicht”, dat wil zeggen dat mensen er voor moeten zorgen dat die omgeving niet wordt aangetast en dat het dier in die omgeving zelf voor zijn welzijn kan zorgen. Als we nu kijken naar de praktijk van de dierproeven, dan valt op dat deze moeilijk te verdedigen is vanuit een zorgethische visie. Immers proefdieren leven in een omgeving die totaal door de mens wordt bepaald (en ook beperkt) en toch tasten wij hun welzijn doelbewust aan. Weliswaar streven wij naar een minimale aantasting, maar in de praktijk worden er veel dieren ernstig in hun welzijn aangetast. Ook hier geldt, net zoals bij de deontologie, dat op het eerste gezicht zorgethiek binnen de dierproeven een gepasseerd station is.

Maar ook hier wil ik kijken of er toch niet winst valt te behalen door een bewuste proefdierkeuze te maken. Hiervoor wil ik me concentreren op de relatie tussen mens en dier. Mensen hebben met verschillende dieren verschillende relaties. Ik bedoel dit hier verdergaand dan de emotionele belasting die mensen voelen bij het gebruik van bijvoorbeeld apen omdat zij zich met deze dieren beter kunnen identificeren. Dit is een éézijdige beschrijving van de relatie van mens naar dier. Relaties zijn tweezijdig. Ethologisch onderzoek heeft uitgewezen dat met name dieren die sociaal leven stilzwijgende onderlinge afspraken lijken te hebben hoe zich te gedragen in een groep. Zo blijven apen in de dierentuin ieder op hun plaats zitten wachten als de oppasser appels onder de groep verdeelt. Het wordt geen chaos, de sterkere pikken niet van de zwakkere apen, ieder komt aan de beurt en wacht daarop. Dieren hebben in zo'n geval een verwachting van elkaar (en van de oppasser!). Sterker nog, dieren kunnen rekeningen bijhouden en onthouden van welke groepsgenoten zij in voorkomende gevallen hulp hebben gekregen in bijvoorbeeld een gevecht. Dieren die wel om hulp werd "gevraagd" maar deze niet gaven worden later ook niet geholpen, want: voor wat hoort wat. Nu is het bekend dat dieren ook relaties aangaan met mensen. Zo wordt bij van honden verondersteld dat zij mensen zien als mede groepsgenoten en er zijn er vele verhalen bekend van relaties tussen apen en mensen. Dus relaties tussen mens en dier zijn niet eenzijdig; dieren kunnen in relaties verwachtingen opbouwen omtrent het gedrag van soortgenoot maar ook van de mens (denk aan de oppasser, de apen gingen er blijkbaar van uit dat zij allemaal een appel kregen toegeworpen).

Dit vermogen om relaties op te bouwen en verwachtingen te hebben, is waarschijnlijk afhankelijk van de diersoort en zal in de praktijk ook afhangen van de huisvesting en verzorging. Het zijn veelal sociaal levende dieren en zij moeten zo worden verzorgd en gehouden dat zij relaties kunnen opbouwen. Dit betekent dat bij bepaalde diersoorten meer relaties zullen ontstaan tussen verzorger en de dieren dan bij andere diersoorten. Nu is mijn stelling dat wij zo min mogelijk dieren als proefdier moeten gebruiken waarmee wij zorgrelaties opbouwen waarin deze tweezijdigheid een rol speelt. Immers de zorgrelatie die wij met een proefdier hebben moet vroeg of later, bij het doen van het experiment, in een 'schaderelatie' worden omgezet, waarbij de nadruk ligt op het schaden van het dier. Dit is frustrerend voor het dier (vanuit utilistisch oogpunt al niet goed) maar het is ook een schaden van het principe dat je extra zorgplicht hebt ten opzichte van dieren waarmee je een relatie

hebt. Bovendien zou je het ook kunnen omschrijven als “wreed” van de mens en “wreedheid” is nu niet bepaald een deugd.

Samenvattend, ook vanuit de zorgethiek zijn dierproeven zeer problematisch, maar daar waar tweezijdige relaties worden geschaad is het nog erger. Met sommige dieren (bijvoorbeeld honden en apen) zijn wij geneigd meer (tweezijdige) relaties op te bouwen en dat geeft extra morele schade. Deze dieren moeten dus als proefdier worden vermeden.

### **Conclusie**

Vanuit de verschillende ethische theorieën zijn er goede redenen om in bepaalde gevallen gericht te kiezen voor de een of voor de andere diersoort. Er valt morele winst te maken met zo'n keuze en daarom kan een andere diersoort als alternatief fungeren bij dierproeven. Het alternatief laat zich in de utilistische manier van redeneren goed vangen in de drie V's. Vervangen, verminderen en verfijning reduceren de hoeveelheid dierlijk lijden. Vervangen en verminderen leveren morele winst op in alle theorieën want het proefdiergebruik is hoe dan ook het probleem en dus hoe minder hoe beter. Wat opvalt, is dat de winst die met de keuze van een andere diersoort te behalen valt, soms niet te vangen is onder de drie V's. Dat komt omdat deze ten eerste louter op het *dierlijk* lijden zijn gericht, terwijl morele winst zich ook laat omschrijven in winst op menselijk lijden. Ten tweede treedt er morele winst op waar het gaat om het respecteren van bewustzijn en relaties en op het gebied van de menselijke deugd en die laten zich niet of minder vangen in de 3 V's. Uit dit essay blijkt dat dierproeven zich vanuit de verschillende ethische theorieën moeilijk laten verdedigen. Vooral de deontologische ethiek en zorgethiek lijken een gepasseerd station te zijn bij dierproeven. Dat wij de lijdende medemens willen helpen is een goed ding. Dat wij dit niet anders kunnen doen dan met dierproeven is wellicht een noodzakelijk kwaad. Maar zowel de deontologische ethiek als ook de zorgethiek roepen ons op om die noodzakelijkheid zeer kritisch te blijven bekijken. Dat is niet alleen omdat we dieren schaden, maar ook omdat het doen van dierproeven onze eer te na zou moeten zijn.



## **Literatuur**

- Stafleu F.R. (1994) The ethical acceptability of animal experiments as judged by researchers. Proefschrift Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht.
- Swart J.A.A. (2005) 'Care for the wild. Dealing with a pluralistic practice' *Environmental Values*. 14 (2): 251-263.
- Swart J.A.A. (2004) Zijn sommige dieren meer gelijk dan andere dieren? In: Jac. Swart, Jan Wolters, Hub Zwart (red.), *DEC's in discussie, de beoordeling van dierproeven in Nederland*, Budel Damon, 2004, 69-78.

# Zijn dierproeven noodzakelijk?

*Frank Wassenberg*

Dierproeven mogen zich verheugen in een grote maatschappelijke belangstelling. Betrokkenen bij dierproeven en tegenstanders van dierproeven vliegen elkaar in de media geregeld in de haren; op opiniepagina's van kranten, in radio- en televisieprogramma's wordt steeds vaker aandacht besteed aan de ethische dilemma's rond dierproeven. Ook het afgelopen jaar was dat het geval. De evaluatie van de Wet op de dierproeven was in het nieuws, waarbij alles draaide om de vraag of dierproeven voortaan in de openbaarheid zouden moeten plaatsvinden. Er vonden heftige discussies plaats over de vraag of een reclamespot van Proefdiervrij wel of niet door de beugel kon,<sup>1</sup> over de zin of onzin van sommige dierproeven en over de veiligheid of onveiligheid van onderzoekers. De discussies zijn vaak fel en emotioneel van toon. Dat is niet vreemd. Proefdiergebruik is een onderwerp waar grote maatschappelijke tegenstellingen elkaar ontmoeten. Dat kan flink botsen.

## **Ruim een eeuw discussie**

Voor de oppervlakkige toeschouwer lijkt alle ophef over proefdiergebruik misschien een recent verschijnsel, maar dat is het allesbehalve. Al meer dan honderd jaar nemen voor- en tegenstanders van dierproeven elkaar de maat. Reeds in de negentiende eeuw bestond er groot ongenoegen in de samenleving over dierproeven (die toen nog *vivisectie* werden genoemd). Dit ongenoegen resulteerde in 1897 in de oprichting van de Nederlandse Vereniging tot Bestrijding van de Vivisectie, later omgedoopt tot Proefdiervrij.

Illustratief voor het maatschappelijk ongenoegen over vivisectie in de late negentiende eeuw is een passage uit het (kinder)boek "de kleine Johannes" van psychiater en schrijver Frederik van Eeden. Het verhaal gaat over de speurtocht van het jongetje Johannes naar de Waarheid (met een hoofdletter geschreven!). Johannes zoekt de Waarheid in de religie, in de natuur en in de wetenschap. Zo wordt hij tegen zijn wil betrokken bij een dierproef.

1 De Reclame Code Commissie vond in hoger beroep van wel.

Op de onderzoekstafel ligt een vastgebonden konijntje. De onderzoeker vraagt Johannes om te helpen met een experiment op het dier. De jongen stribbelt tegen; hij wil het konijn losmaken. Dat is zeer tegen de zin van de wetenschapper, die Johannes bij zijn eerste stappen op het gebied van dierproeven begeleidt.

“Beste jongen!” zei de dokter, “je schijnt nog wat teergevoelig om te beginnen. Het is waar, de eerste maal is zo iets naar om te zien. Ik zelf zie het altijd niet graag en vermijd het zoveel mogelijk. Maar het is onontbeerlijk. En je moet begrijpen: wij zijn mensen en geen dieren, en het heil van de mensheid en van de wetenschap gaat boven dat van enige konijnen.” ..... “De man der wetenschap,” ging de dokter voort, “staat hoger dan alle andere mensen. Maar hij moet dan ook de kleine gevoeligheden, die de gewone mensen kennen, laten varen voor dat éne grote: de wetenschap. Wilt ge zulk een mens worden? Was dat uw roeping, mijn jongen?”

“Nu, dan moet je sterk zijn, Johannes, en niet klein en teerhartig. Dan zal ik je helpen. Maar bedenk: alles of niets.”

De passage eindigt dramatisch met de capitulatie van de kleine Johannes. Met trillende handen maakt hij de strikken rond de poten van het half bevrijde konijntje weer vast. De hoofdpersoon heeft de strijd verloren. Hij is, in de optiek van Van Eeden, zijn onschuld kwijt.

### **Een oude boodschap**

Van Eeden schreef de tekst in 1885. De woordkeuze doet nu wat ouderwets aan, maar de kern van de boodschap van de onderzoeker wordt na meer dan 120 jaar nog opvallend vaak gehoord. Dierproeven worden tegenwoordig niet meer “*naar om te zien, maar onontbeerlijk*” genoemd. De toenmalige staatssecretaris van Sociale Zaken en Volksgezondheid, R.J.H. Kruisinga, omschreef dierproeven in de Memorie van Toelichting (1969) bij de Wet op de dierproeven als “*een noodzakelijk kwaad*”. Die omschrijving werd een standaardfrase. In de jaren tachtig van de vorige eeuw gebruikte NRC-Handelsblad de term in een advertentiecampagne. Bij de afbeelding van een dierproef stelde de krant de vraag: “Noodzakelijk of Kwaad?” en beloofde de nuance te bieden in deze moeilijke discussie. De term duikt ook nu nog op. De titel van de vorig jaar uitgekomen evaluatie van de Wet op de dierproeven was eveneens “Noodzakelijk kwaad” (Freriks et al., 2005). Dit toont dat

de woordkeuze sinds 1885 is veranderd, maar dat de achterliggende boodschap identiek is gebleven: niemand is blij met dierproeven, maar we kunnen helaas niet zonder.

Het is niet verwonderlijk dat er na ruim honderd jaar sleet zit op de boodschap, die in verschillende varianten telkens weer opduikt. Langzamerhand is deze verworpen tot een cliché. Het kan daarom geen kwaad om de omschrijving “noodzakelijk kwaad” eens nader te analyseren. Daartoe splitsen we hem in de delen “Noodzakelijk” en “Kwaad”. Dat proefdiergebruik een “kwaad” is, is een mening die door veel mensen wordt gedeeld. Niet alleen door tegenstanders van dierproeven, maar ook door veel proefdierenonderzoekers. Geen zinnig mens doet voor zijn plezier dierproeven. Het gebeurt altijd voor een “hogere doel” (in ieder geval in de ogen van de proefdiergebruiker). Dat “hogere doel” wordt dan afgewogen tegen de negatieve aspecten van de proef voor het proefdier. Zo wordt het “kwaad” geneutraliseerd of gecompenseerd.

### **Een doel op zich?**

Maar zijn dierproeven ook noodzakelijk? En zo ja, waarom zijn ze noodzakelijk? Als eerste moeten we constateren dat dierproeven geen doel op zich zijn. Dierproeven worden om verschillende redenen uitgevoerd. De dierproef wordt verricht om inzicht te verkrijgen in deelaspecten van een organisme of om informatie te verkrijgen over (de ontwikkeling van) een ziekte, een product, een medicijn, een chemische stof of een vaccin. In veel gevallen is het uiteindelijke doel van de diermodellen om iets over *de mens* te weten te komen. Dierproeven worden ten slotte ook verricht om kennis over te dragen (met name in het onderwijs).

Dierproeven worden *nooit* verricht als doel op zich. Een dierproef is slechts een middel om kennis te vergaren of kennis over te dragen, niet meer dan dat. Dat is ook vastgelegd in de wet. Maar als dierproeven slechts een *middel* tot het verwerven van kennis zijn, zijn ze per definitie niet noodzakelijk! Want niet het middel is noodzakelijk, maar het *doel*. Het is noodzakelijk om onze kennis te vergroten, het is noodzakelijk inzicht in ziektes te krijgen, het is noodzakelijk om ziektes te kunnen genezen, het is noodzakelijk om onze kennis over te dragen. Voor al die doelen wordt veel gebruik gemaakt van dierproeven. De wetenschap maakt gebruik van de overeenkomsten tussen dieren en mensen op het gebied van biochemie, fysiologie en anatomie. De gegevens uit het onderzoek worden uiteindelijk geëxtrapoleerd naar de mens. Niet de gezondheid van het dier, maar van de *mens*

staat centraal in het meeste onderzoek. Een dierproef is slechts een manier om aan noodzakelijke kennisvermeerdering te doen.

Dierproeven zijn niet identiek aan medisch onderzoek, al is niet te ontkennen dat ze op dit moment nog een allesoverheersende rol spelen in de onderzoekswereld. Zó overheersend, dat weinig onderzoekers zich onderzoek zonder dierproeven kunnen voorstellen. Deze visie is zó overheersend, dat het streven naar afschaffing van dierproeven door sommigen wordt verward met het afschaffen van bio-medisch onderzoek. Zeer ten onrechte. Want proefdiervrij onderzoek bestaat wel degelijk. Het valt onder de noemer “alternatieven voor dierproeven”.

### **Een onjuiste term**

Is dit gepraat over doel en middel en over noodzakelijk kwaad slechts muggenzifterij? Een woordspelletje, gespeend van elk belang? Ik vind van niet. De omschrijving “noodzakelijk kwaad” schetst een beeld van de weliswaar onplezierige, maar vooral ook onvermijdelijke dierproef. Noodzakelijk betekent volgens de dikke Van Dale “*iets dat niet vermeden kan worden, volstrekt nodig voor het bereiken van een zeker doel, onmisbaar, onvermijdelijk*”. De beschrijving van een dierproef als iets noodzakelijks, iets onvermijdelijks, iets onmisbaars is een vertekening van de werkelijkheid. Het vertroebelt de discussie. Niet de dierproeven zijn noodzakelijk, maar het vergroten van kennis. Doel en middel worden met de omschrijving door elkaar gehaald. Om dezelfde reden is de term “alternatieven voor dierproeven” naar mijn mening een ongelukkige term. Want ook hier impliceert de omschrijving een onjuiste denkwijze, die inhoudt dat de dierproef de standaard is, waartegen alles wordt gemeten: “we hebben dierproeven als een gegeven standaard en we moeten proberen om deze te vervangen door iets anders”. Opnieuw wordt het *middel* (de dierproef) met deze woordkeuze impliciet tot *doel* verheven. Dat is niet terecht.

### **Alternatieven**

Er is nog een andere reden om terughoudend te zijn met de kwalificatie “noodzakelijk” als het om dierproeven gaat. Want als dierproeven noodzakelijk zijn, en dus niet te vermijden en onmisbaar, hoe moeten we dan naar alternatieven voor dierproeven kijken? Iets dat onvermijdbaar en onmisbaar is, is daarmee automatisch ook onvervangbaar. Als dierproeven een noodzakelijk kwaad zijn, houdt dat automatisch in dat het streven naar alternatieven voor dierproeven onzinnig is. Gelukkig is die stelling niet houdbaar; dat bewijst de

praktijk. Veel dierproeven blijken te vervangen te zijn door experimenten die geen of veel minder dierenleed opleveren (minder leed en minder dieren). Op dit ogenblik is echter nog voor lang niet alle dierproeven een vervanging in zicht. Voor andere proeven is het wel denkbaar dat er op kortere of langere termijn alternatieven voorhanden zijn. Wanneer er goedgekeurde alternatieven bestaan, is het volgens de wet zelfs strafbaar om toch nog de dierproef uit te voeren. Het noodzakelijke karakter van dierproeven blijkt dus niet absoluut te zijn, maar veranderlijk in de tijd. Wat vandaag noodzakelijk wordt genoemd, kan morgen achterhaald of overbodig zijn. Naar mijn mening doet de term “noodzakelijk kwaad” daarom geen recht aan de complexiteit van de dierproef. Want hoe kan een weldenkend mens tegen dierproeven zijn, als die noodzakelijk zijn en daarom niet gemist kunnen worden? De woordkeuze “noodzakelijk kwaad” slaat op die manier elke discussie dood. Het is een lege term, die veel suggereert (“niemand vindt het leuk, maar we kunnen nu eenmaal niet anders”), maar weinig betekent.

Terug naar de discussie over de alternatieven voor dierproeven. Als het gaat om het streven naar een reductie van het proefdiergebruik en waar mogelijk het afschaffen van bepaalde dierproeven, is de mening van Proefdiervrij zeker niet onverenigbaar met die van veel wetenschappers. Dat betekent overigens allerminst dat Proefdiervrij en “de wetenschapswereld” het roerend met elkaar eens zijn of dezelfde uitgangspunten delen. Want die uitgangspunten zijn wezenlijk verschillend.

Proefdiervrij heeft als eerste taak het opkomen voor het proefdier en het beperken en uiteindelijk afschaffen van dierproeven. Dat is niet de eerste taak van veel wetenschappers. Zij houden zich bezig met bijvoorbeeld een bepaald onderzoek naar specifieke ziektebeelden bij de mens en gebruiken voor de beantwoording van de onderzoeksvragen diermodellen. Het zoeken naar andere onderzoeksmethoden is niet de belangrijkste taak waarmee zij opgezadeld zijn. Dat betekent overigens niet dat zij automatisch negatief tegen andere onderzoeksmethoden dan het gebruik van diermodellen staan, maar het is niet hun grootste zorg. Dat laatste geldt slechts voor een enkeling, die in de proefdierkunde werkt of onderzoek doet naar proefdiervrije onderzoeksmethoden.

### **Een vierde V?**

Waar zouden we naar moeten streven? Als het aan Proefdiervrij ligt, zou de medisch-biologische wetenschap zich verder moeten ontwikkelen in een

richting waar onderzoek en vooruitgang niet langer synoniem zijn met dierproeven. Nu is dat te vaak wel het geval. Belangrijk is dat bij het beantwoorden van onderzoeksvragen niet direct en automatisch het proefdiermodel in beeld komt. Dat betekent ook dat naar onze mening de 3 V's niet meer voldoen. Want of het nu gaat om vervangen, verminderen of verfijnen van dierproeven, de dierproef is, zoals eerder betoogd, toch weer de standaard waarvoor een alternatief moet worden gezocht. Een vierde V is daarom nodig: de V van voorkomen van dierproeven. Want wat voorkomen kan worden, hoeft niet vervangen of verminderd of verfijnd te worden. Dat betekent in de praktijk een verandering van denkwijze. We stellen de onderzoeksvraag centraal en niet de dierproef.

Dat de "klassieke" drie V's niet voldoen, hoeft niemand te verbazen die zich wel eens heeft verdiept in de cijfers over proefdieren en dierproeven in Nederland. Een gestage daling van het aantal dierproeven die sinds het einde van de jaren zeventig van de vorige eeuw werd ingezet, kwam eind jaren negentig abrupt tot een einde. Sinds die tijd is het aantal dierproeven in Nederland weer toegenomen. De laatste paar jaar schommelde het aantal rond de 600.000. Met deze stilstand mogen we geen genoegen nemen. Het regeringsbeleid in Nederland (net als dat in alle andere EU-landen) zou erop gericht moeten zijn om dierproeven langzaam maar zeker te verminderen en waar mogelijk te vervangen (en liever nog te voorkomen). Die doelstelling wordt niet gehaald. Het is dus tijd voor een ambitieuze nieuwe impuls. De aanzet tot die impuls zal niet in de eerste plaats door de gemeenschappelijke wereld gegeven kunnen worden. Elke wetenschapper heeft zijn of haar eigen onderzoeksdoelen, staat in een bepaalde onderzoekstraditie en heeft zijn of haar eigen onderzoeksprioriteiten.

### **Politiek is aan zet**

Hier ligt een duidelijke taak voor de politiek, die mijns inziens haar verantwoordelijkheid op dit gebied niet af mag schuiven. De wetenschap kan niet alleen worden opgezadeld met het probleem van het (hoge) proefdiergebruik. Wetenschappers kunnen en zullen een belangrijke bijdrage leveren aan het (opnieuw) terugdringen van het proefdiergebruik, maar de impuls hiertoe moet vanuit Den Haag komen. Allereerst moet er meer onderzoeksgeld beschikbaar worden gesteld aan de ontwikkeling van nieuwe testen en onderzoeksmethoden en de verdere ontwikkeling van bestaande alternatieven. Het bedrag van 900.000 euro dat nu jaarlijks beschikbaar is voor de ontwikkeling van alternatieven staat in geen verhouding met de hon-

derden miljoenen die elk jaar besteed worden aan het medisch-biologisch onderzoek waarbij wel proefdieren worden gebruikt.

Maar geld is niet de enige factor. Naar de mening van Proefdiervrij zou de wetgeving op het punt van alternatieven minder vrijblijvend moeten worden dan nu het geval is. In de Nederlandse wet staat geen enkele bindende clausule over het onderzoek naar en de ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeks- en testmethoden. Ook criteria voor een alternatieventoets zijn niet in wet- en regelgeving verankerd. Uit de schaarse informatie die er bestaat over het functioneren van DEC's blijkt nergens dat een grondig onderzoek naar denkbare alternatieven voor de voorgenomen dierproef een onderdeel vormt van een DEC-toets. Het ontbreken van een duidelijk omschreven en van bovenaf opgelegd toetsingskader resulteert in een grote mate van vrijblijvendheid in de alternatieventoets zoals deze door de verschillende DEC's worden uitgevoerd. Iedere DEC heeft zijn eigen criteria moeten opstellen als het gaat de alternatieventoets. Als er al criteria zijn vastgelegd, wat vaker niet dan wel het geval is.

In de praktijk betekent het, dat de alternatieventoets aan geen enkele universele en vastomlijnde voorwaarde hoeft te voldoen. Een goed uitgevoerde alternatieventoets hangt volledig af van de intenties van de verantwoordelijke DEC. Het ontbreken van een systeem brengt hierdoor met zich mee dat er onvermijdelijk grote verschillen in beoordeling mogelijk zijn tussen de 26 verschillende DEC's als het gaat om het beoordelen van alternatieven voor een aangevraagd onderzoek. Het ontbreken van openbaarheid rond DEC-adviezen brengt een oplossing voor dit probleem niet naderbij. Voor Proefdiervrij is dit aanleiding om te pleiten voor een goede en algemeen geldende alternatieventoets die zou moeten worden opgesteld door overheid, uiteraard met hulp en steun van de Nederlandse Vereniging van Dierexperimentencommissies en de Centrale Commissie dierproeven.

### **Dierenwelzijn wordt een belangrijke Europese kwestie**

Daarnaast zou Nederland, veel meer dan nu het geval is, een voortrekkersrol moeten en kunnen spelen op het gebied van proefdiervrije testmethoden. Dat zou Nederlands internationale positie op het gebied van proefdiervrije onderzoeksmethoden sterk verbeteren. En daar kan Nederland en het Nederlandse onderzoek alleen maar van profiteren. Aandacht voor dierenwelzijn, zeker op proefdierengebied, is geen voorbijgaande rage. Het onderwerp dierenwelzijn zal de komende jaren alleen maar aan belang winnen, zeker in Europa.



Waar ik mijn betoog begon met een verwijzing naar de negentiende-eeuwse geschriften van Frederik van Eeden, wil ik eindigen met een minder poëtische, maar zeker zo belangrijke tekst uit de eenentwintigste eeuw. Want op 23 januari, 2006 presenteerde EU-Commissaris Kyprianou van Gezondheid namens de Europese Commissie een actieplan om het dierenwelzijn in de EU te bevorderen<sup>2</sup>. Hieruit blijkt dat Brussel zich in de komende vijf jaar hard gaat maken voor een verbetering van het dierenwelzijn. De Europese Commissie realiseert zich dat dierenwelzijn een toenemende zorg is van de bevolking en heeft de intentie aangegeven om deze zorg te vertalen in strengere wetgeving op het gebied van dierenwelzijn. Concrete stappen worden in het Action Plan nog niet genoemd. Maar de intenties van de Europese Commissie voor de periode 2006-2005 laten aan duidelijkheid weinig te wensen over:

- De standaarden voor dierenbescherming en dierenwelzijn gaan omhoog.
- Beleidsgeoriënteerd proefdieronderzoek en de toepassing van de drie V's krijgen een hoge prioriteit.
- Er worden gestandaardiseerde dierenwelzijnsindicatoren geïntroduceerd.
- Dierenverzorgers en het algemene publiek worden meer betrokken en geïnformeerd over dierenwelzijnsaspecten.
- Verdergaande internationale initiatieven zullen worden ondersteund en ondernomen teneinde het bewustzijn over dierenwelzijn te verhogen en een grotere eensgezindheid hierover te creëren.<sup>3</sup>

De plannen moeten nog nader worden uitgewerkt, maar de Europese tendens is onmiskenbaar en onomkeerbaar: dierenwelzijn gaat een steeds belangrijker rol spelen. Dat zal ook het geval het op proefdierengebied. De ontwikkeling van proefdiervrije test- en onderzoeksmethoden zal sterk aan belang winnen. Het grote publiek zal beter worden geïnformeerd over dierenwelzijnszaken. Daarnaast zullen de algemene eisen die aan dierenwelzijn (en daarmee ook proefdierenwelzijn) worden opgeschroefd. Nederland kan natuurlijk kalm afwachten op de stappen die Europa zal nemen, om dan, gedwongen door nieuwe en aangescherpte richtlijnen, in de achterhoede aan te hobbelen achter de Europese ontwikkelingen. Maar Nederland kan er ook voor kiezen om nu echt werk te maken van de ontwikkeling van

2 Zie voor voor het persbericht van de EU (Improving animal Welfare, EU Action Plan adopted (Brussel, 23 januari 2006, IP/06/64): <http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/06/64&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>

3 Citaat uit de verklarende tekst bij het EU Action Plan, eveneens te vinden via de website die in de vorige voetnoot is genoemd.

alternatieven voor dierproeven) en op die manier een voorsprong te nemen in het belangrijke proefdiervrije wetenschapsterrein. Het zal niemand verbazen dat Proefdiervrij een groot voorstander is van deze laatste optie.

### **Literatuur**

Freriks A.A., Meulen B.M.J. van der, Belt van der H., Holt ten H. & Verstappen J. (2005) Noodzakelijk kwaad. Evaluatie Wet op de dierproeven. Reeks evaluatie regelgeving: deel 18, ZonMw: Den Haag.

# De kanarie in de kolenmijn: de mens als alternatief

*Cees Smit*

De levensverwachting van de mens is nog steeds aan het stijgen. Wie in 1900 in Nederland werd geboren, had 50 procent kans om 50 te worden en wie in 2000 werd geboren, heeft 50 procent kans om 80 jaar te worden.<sup>1</sup> Behalve een winst van 30 levensjaren in een eeuw tijd, is voor de meeste mensen ook de kwaliteit van leven sterk verbeterd. Naast verbeteringen op het terrein van het wonen, de sociale voorzieningen en de hygiëne, heeft ook de vooruitgang van de medische kennis en technologie aan deze gestegen levensverwachting een belangrijke steen bijgedragen.

In het bijzonder patiënten: mensen met een ziekte – of het nu om een erfelijke of een chronische ziekte, een zeldzame of een veel voorkomende aandoening gaat – hebben van deze medische vooruitgang geprofiteerd. En vooral voor kinderen heeft de medische vooruitgang tot een wereld van verschil geleid. Vroeger overleden veel kinderen vaak op jonge leeftijd. Nu worden ze volwassenen, vormen gezinnen en starten carrières. In het medisch onderzoek dat tot deze vooruitgang heeft geleid, hebben proefdieren een belangrijke rol gespeeld.

## **De rol van proefdieren bij de medische vooruitgang**

Bloedtransfusies, niertransplantaties, openhartoperaties, nieuwe heupen, behandelingen voor kanker, insuline-injecties, antibioticakuren, vaccinaties. Het scala aan medische handelingen en behandelingen die tot stand komen of zijn gekomen met behulp van proefdieren is zeer breed. De waardering hiervoor is groot, vooral onder die patiënten die op de hoogte zijn van deze relatie. Vooral bij nieuwe medische ontwikkelingen raken patiënten zich bewust van de rol van dierproeven. Bij het begrijpen en leren van nieuwe operatietechnieken zoals indertijd bij de opkomst van hart- of niertransplantaties vormen de ervaringen met proefdieren een onderdeel van de gesprekken tussen de behandelende arts en de patiënt. En hetzelfde geldt voor de rol die proefdieren hebben gespeeld bij het ontwikkelen van medi-

<sup>1</sup> Rozendaal S. Kop op. Elsevier, 28 januari 2006.

cijnen om afstotingsreacties tegen getransplanteerde organen te verminderen of te voorkomen.

Maar iemand die tegenwoordig een nieuw hart of een nieuwe nier krijgt, zal zich al veel minder bewust zijn van de rol die proefdieren bij de ontwikkeling van die techniek hebben gespeeld omdat het inmiddels bekende en betrouwbare operatietechnieken zijn. Het krijgen van een nieuw hart wordt als een van de technische verworvenheden van de huidige maatschappij beschouwd waarbij de mogelijkheden slechts beperkt lijken te worden door het aantal beschikbare donororganen.

### **Toenemende betrokkenheid van patiëntenorganisaties**

Tegen de achtergrond van deze vooruitgang is het voor onderzoekers vaak moeilijk te begrijpen dat hun werk met proefdieren wordt bekritiseerd. Zij zijn zich heel goed bewust van zowel de mogelijkheden die nieuwe behandelingen bieden die tot stand zijn gekomen met behulp van proefdieronderzoek als van de consequenties van deze proeven voor het welzijn van de dieren. Dit dilemma en de maatschappelijke discussie rond het gebruik van proefdieren komen steeds vaker aan de orde *binnen* patiëntenorganisaties. Soms omdat de leden van een patiëntenorganisatie door tegenstanders van proefdiergebruik worden neergezet als mensen met een enge ziekte zoals gebeurde in een campagne van de Stichting Proefdiervrij in 2000 over de ziekte van Pompe. De campagne ging over het jongetje Dicky, die een konijn wil om mee te spelen, maar zo werd gezegd: 'hij heeft ook een enge spierziekte, de ziekte van Pompe'. De betreffende patiëntenorganisatie, de Vereniging Spierziekten Nederland (VSN) tekende bezwaar aan tegen deze campagne bij de Reclame Code Commissie en hun bezwaar werd gehonoreerd. De Commissie achtte de zinsnede 'enge ziekte' nodeloos kwetsend voor mensen met een chronische ziekte en in dit specifieke geval voor iemand met de ziekte van Pompe.<sup>2</sup>

Een andere reden voor de aandacht van patiëntenorganisaties voor de discussie over dierproeven is dat er angst bestaat dat het verzet tegen dierproeven het onderzoek naar de oorzaken en de behandeling van de eigen ziekte in gevaar zal brengen. Daarbij ervaart men een onevenredige nadruk op het gebruik van dierproeven in vergelijking met andere maatschappelijke praktijken waarin dieren worden gebruikt. Dit komt bijvoorbeeld scherp naar voren in het volgende citaat uit een nieuwsbrief van de Nederlandse

2 VSN-Nieuwsbericht: campagne was kwetsend en misleidend, 18 mei 2000.

Federatie van Kankerpatiëntenverenigingen (NFK): “Voor iedere kankerpatiënt wordt gemiddeld 1,3 muis gebruikt in dierexperimenteel onderzoek. Vergelijk je dat met de vissen die in de sportvisserij het leven laten of met de 400 miljoen slachtkuikens die de bio-industrie jaarlijks produceert dan is dat alleszins aanvaardbaar. Ondertussen wordt de regelgeving rond het gebruik van proefdieren zo streng dat het kankeronderzoek daardoor belemmerd wordt...”<sup>3</sup>

In de *maatschappelijke discussie over nut en noodzaak van dierproeven* komt de stem van patiëntenorganisaties echter nog weinig naar voren. Hetzelfde geldt voor het onderwerp *alternatieven voor dierproeven*. De discussie rond deze onderwerpen zou echter zeer wel kunnen profiteren van de inbreng vanuit de patiëntenbeweging, zeker wanneer de maatschappelijke inzet gericht is op meer openheid rondom dierproeven en, op termijn, op vermindering van het aantal dierproeven. Patiënten en de meer dan 400 ziektespecifieke organisaties waarin zij verenigd zijn, kunnen vaak heel goed beoordelen wat het belang van dierproeven is. Niet omdat zij zonder meer voorstander zijn van dierproeven, maar omdat zij vanuit eigen ervaring hebben meegemaakt wat medisch-wetenschappelijk onderzoek met behulp van dierproeven voor hen heeft opgeleverd. Patiëntenorganisaties zouden dit aspect in de maatschappelijke discussie meer naar voren kunnen brengen, zodat voor het grote publiek veel duidelijker wordt wat de relatie is tussen verricht proefdieronderzoek en het belang daarvan voor een bepaalde ziekte. Zo hebben mensen met de ziekte van Rendu Osler Weber veel last van spontane bloedneuzen, die zeer ernstig kunnen zijn. De voorlichtingssite over deze ziekte van het St. Antonius Ziekenhuis te Nieuwegein heeft als symbool een muis met een bloedneus, vanwege de belangrijke rol die proefdieronderzoek met muizen speelt bij het zoeken van een oplossing voor deze ziekte.<sup>4</sup>

### **De wisselwerking tussen het welzijn van mens en dier**

Uit het bovenstaande volgt dat er een wisselwerking bestaat tussen het welzijn van mens en dier. Die wisselwerking impliceert ook een winst voor dieren want niet alleen mensen profiteren van onderzoek met proefdieren, ook dieren profiteren van de kennis die de medische wetenschap voort heeft

3 E-mail nieuwsbrief Nederlandse Federatie van Kankerpatiëntenverenigingen (NFK), 10 november 2005.

4 <http://www.renduoslerweber.nl>

gebracht en die via de diergeneeskunde weer tot hen komt. Een duidelijk voorbeeld van deze wisselwerking is het huidige onderzoek naar gentherapie bij de mens. Een van de onderzoekslijnen is gericht op het opheffen van vormen van blindheid bij de mens (de ziekte van Leber). Daarbij is in de beginfase van het onderzoek gebruik van dieren onvermijdelijk. Zo hebben Amerikaanse onderzoekers gentherapie toegepast bij honden van het ras Briard die een erfelijke afwijking hebben die hen nagenoeg blind maakt. De Amerikanen gebruikten voor hun proeven drie honden van het Briard-ras, die door een mutatie in het RPE65-gen een onvolledig oogeiwit maken. Voor de gentherapie gebruikten de onderzoekers een onschadelijk virus dat het ontbrekende gen in de retinacellen van de hond bracht. De onderzoekers injecteerden alleen in het rechteroog, het andere lieten zij ter controle onbehandeld. Het resultaat was boven verwachting. Met hun rechteroog zagen de drie behandelde honden weer bijna net zo goed als normaal. Moeiteloos konden zij in het halfduister hun weg vinden door een doolhof, terwijl blinde soortgenoten stil in een hoekje bleven zitten uit angst tegen een muur te lopen.<sup>5</sup> De betreffende onderzoekers hebben door het bekend worden van de resultaten van hun onderzoek forse aanvullende financiering gekregen van mensen die een hond met al dan niet erfelijke blindheid hebben en genezing voor hun huisdier zochten. Een ander, vergelijkbaar voorbeeld is het gedeeltelijk herstel – met ruim de helft – van het gehoor van dove cavia's.<sup>6</sup> In al deze gevallen is de kwaliteit van leven van deze dieren aanzienlijk verbeterd.

Dus, ook voor dieren en hun eigenaren geldt dat zij kunnen profiteren van de vooruitgang van medisch-wetenschappelijk onderzoek. Dit komt vooral tot uiting in de ontwikkeling van de diergeneeskunde en het voortdurend stijgen van de bedragen die eigenaars van dieren uitgeven aan de gezondheidszorg van hun (huis)dieren.<sup>7</sup> Zo werd in 2003 in VS een bedrag van 1.32 biljoen dollar uitgegeven voor operaties aan de kniegewrichten van honden.<sup>8</sup>

5 Gentherapie laat blinde honden zien. NRC Handelsblad 30 april 2001.

6 Korteweg N. Gentherapie herstelt gehoor bij dove cavia's voor ruim de helft. NRC Handelsblad 27 februari 2005.

7 Niet elk medisch ingrijpen draagt evenwel bij aan een verbetering van leven. Dit geldt zowel voor mensen als dieren.

8 Wall Street Journal, 11 april 2006.

### **De mens als alternatief**

Wat in de discussie over alternatieven voor proefdieren nogal eens wordt vergeten, is dat men soms bewust de stap van het doen van proefdieronderzoek overslaat bij patiënten met een slechte prognose. Het zijn dan niet de dieren, maar de patiënten zelf die als 'proefdier' fungeren (Guerrini, 2003). Het toepassen van vaak nog experimentele behandelingen bij mensen met een slechte prognose van kanker is hiervan een voorbeeld. Ook de toepassing van aids-remmers werd gestart op basis van 'compassionate use' omdat er onvoldoende tijd was met dierproefstudies de veiligheid en werking van deze nieuwe medicijnen volledig en langs de gebruikelijke weg uit te testen. En nog steeds gebruiken vele honderdduizenden mensen met aids elke dag deze medicijnen in het volle besef dat op termijn zich bijwerkingen kunnen voordoen die we nu niet of onvoldoende kennen. Maar in al deze gevallen is er voor de betreffende patiënten vrijwel geen keuze: òf onmiddellijk overlijden ten gevolge van het ontbreken van een medicijn òf later sterven als gevolg van een nu nog niet bekende bijwerking.

Wat eveneens weinig ter sprake komt is, dat bijna alle nieuwe geneesmiddelen eerst op gezonde vrijwilligers worden getest, voordat de kleine groepen patiënten deze experimenteel gaan uitproberen. Het is dus onjuist te suggereren dat de mens alle risico's afwentelt op het proefdier. Recent is dit nog zeer pregnant naar voren gekomen bij het gebruik van de experimentele antistof TGN1412 bij zes proefpersonen. De antistof werd per injectie toegediend met een interval van twee minuten per proefpersoon. Amper vijf minuten nadat de laatste proefpersoon zijn dosis had ontvangen, klaagde de proefpersoon die als eerste een dosis ontving over zware hoofdpijn, koorts en pijn. Kort daarna werden ook de andere proefpersonen ernstig ziek (Kievits & Adriaanse, 2005).

### ***Ziekte van Pompe***

Een ander, recent voorbeeld van de mens als proefdier is het onderzoek naar een medicijn voor de Ziekte van Pompe, dat gemaakt is uit de melk van transgene konijnen. Onderzoekers in het Rotterdamse Sophia kindziekenhuis - met name Arnold Reuser en Ans van der Ploeg - zijn er in geslaagd om het menselijk gen dat codeert voor de aanmaak van het enzym, dat de patiënten met Pompe missen, te kloneren. Vervolgens is de stap gemaakt dit menselijk Pompe-gen in te bouwen bij muizen en daarna bij konijnen. Aldus genetisch gemodificeerd gingen de konijnen het menselijk Pompe enzym in hun melk afscheiden. Vervolgens kwam de stap het zo ontwik-

kelde medicijn toe te passen bij patiënten. In eerste instantie bij vier baby's en peuters met de ziekte van Pompe en vervolgens bij drie oudere patiënten. Vooral de eerste groep heeft – onbehandeld - een slechte levensprognose en zal waarschijnlijk al tijdens het eerste levensjaar komen te overlijden. Al snel werd duidelijk dat het door konijnen afgescheiden middel werkte. Zonder deze experimentele behandeling waren waarschijnlijk alle vier de patiëntjes al overleden, nu zijn drie van hen nog in leven. Ook de drie oudere patiënten leven nog (Smit, 2005). Vanwege redenen die buiten het bestek van dit artikel vallen is de productie van het medicijn uit de melk van transgene konijnen inmiddels stopgezet. De behandeling van patiënten met de Ziekte van Pompe vindt nu plaats met behulp van een recombinant geneesmiddel, gemaakt uit de cellijnen van Chinese hamsters.

### ***'Bubble boy' kinderen***

Een ander voorbeeld, waarbij patiënten een cruciale rol vervuld hebben in het onderzoek, zijn de genterapiestudies bij kinderen met de immuundeficiëntieziekte SCID, de zogenaamde 'bubble boy' kinderen. Zonder behandeling is hun levensverwachting zeer beperkt, maar met de genterapiebehandeling is hun levensverwachting aanzienlijk toegenomen. Het Franse onderzoek hiernaar is stopgezet, omdat zich bij een drietal kinderen een vorm van leukemie heeft ontwikkeld. Een van deze drie kinderen is daaraan overleden. Maar bij dit gegeven moet de kanttekening worden gemaakt dat van de tien oorspronkelijke deelnemers aan de studie er meer zouden zijn overleden indien er geen genterapiebehandeling was toegepast.

### **De kanarie in de kolenmijn**

Veel van het huidige onderzoek met proefdieren, betreft *het uittesten van medicijnen voor wat betreft hun veiligheid en werking*. Vooral de problemen die het gebruik van Thalidomide (Softenon) in het verleden heeft veroorzaakt, hebben gezorgd voor wet- en regelgeving die het noodzakelijk maken nieuwe geneesmiddelen vooraf te laten gaan door een testfase met proefdieronderzoek. Door deze regelgeving is zeker een aantal nieuwe tragedies voorkomen.

Maar ook wanneer een uitgebreide testfase van proefdieronderzoek aan de introductie van een nieuw medicijn voorafgaat, kan het toch nog zo zijn dat zich onverwachte problemen voordoen en voor de mens ernstige bijwerkingen optreden. Een goed voorbeeld hiervan is de pijnstillers en ontstekingsremmers VIOXX. Deze en andere COX-II remmers wekten hoge ver-



wachtingen omdat ze bij reuma en artritis minder schadelijk zouden zijn voor maag en darmen dan de oudere NSAID's (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs). Toch is VIOXX uit de handel gehaald omdat bij toepassing op grote(re) schaal bijwerkingen bleken zoals ernstige en soms fatale hartproblemen. Dit is een duidelijk voorbeeld van hoe complex zaken zijn: bijwerkingen die bij 1 op de 10.000 of 100.000 mensen optreden zullen tijdens de klinische onderzoeksfasen II en III niet worden ontdekt omdat de gebruikersaantallen dan te klein zijn. Pas wanneer een middel 'all out' over de hele wereld wordt voorgeschreven aan gigantische aantallen reuma en artritis patiënten komen dit soort bijwerkingen aan het licht.

Daarnaast is het zo dat zich nieuwe ontwikkelingen kunnen voordoen die ook met behulp van proefdieronderzoek of onderzoek bij mensen niet te vermijden zijn. Een voorbeeld van het laatste heeft betrekking op de titel van dit verhaal "de kanarie in de kolenmijn". De kanarie die door mijnwerkers meegenomen werd naar beneden en die hen waarschuwde voor een dreigend gebrek aan zuurstof. Op vergelijkbare wijze werden mensen met hemofilie (een erfelijke afwijking in de bloedstolling) zo'n 20 tot 25 jaar geleden geconfronteerd met virusinfecties zoals hepatitis B en C, en Aids, die in die tijd niet met behulp van een simpele test bij bloeddonoren konden worden ontdekt (nu kan dat wel). Het risico van overdracht van het aids-virus en andere virussen bij bloedtransfusies werd als eerste bij hemofiliepatiënten ontdekt. In de beginjaren van het aids-probleem werd daarom heel snel gezocht naar een test die het mogelijk zou maken het aids-virus op te sporen bij bloeddonoren om zodoende de overdracht van het aids-virus naar ontvangers van bloed en bloedproducten te voorkomen. Een situatie, die we nu volkomen vanzelfsprekend vinden.

### **Toekomstig beleid**

Eerder in dit artikel is gesteld dat de discussie rond dierproeven zeer wel zou kunnen profiteren van de inbreng vanuit de patiëntenbeweging, zeker wanneer de maatschappelijke inzet gericht is op vermindering van het aantal dierproeven en meer openheid rond dierproeven. Patiënten en de hun vertegenwoordigende organisaties zijn meer en meer betrokken bij de totstandkoming van de beleids- en onderzoeksprioriteiten in het wetenschappelijk onderzoek. Soms ook nemen zij zelf op een volwaardige wijze deel aan het wetenschappelijk onderzoek door deelname in onderzoeksconsortia of het starten van een eigen bedrijf (Rozendaal, 2006). In die positie realiseren zij zich terdege dat het weinig zinvol is te investeren in onderzoek dat

onderzoekstechnisch slecht van opzet is of buitenproportioneel lijden voor proefdieren veroorzaakt. Aandacht voor proefdierwelzijn is eveneens noodzakelijk - als doel op zichzelf en om pragmatische redenen – omdat proefdieren die in slechte conditie verkeren ook niet zullen bijdragen aan het verkrijgen van solide onderzoeksresultaten. Bovendien realiseren zij zich dat het niet handig is te investeren in proefdieronderzoek dat onnodig omvangrijk in aantal of tijdsduur is. In Nederland mag echter worden aangenomen dat door de rol van Dierexperimentencommissie's (DEC's) en de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD) goed gelet wordt op de morele en proefdierkundige kwaliteit van dierproeven.

Daarnaast kan door de inbreng van Europese koepelorganisaties van patiënten bovendien een meerwaarde van het onderzoek worden gerealiseerd door een goede coördinatie van het onderzoek onder bepaalde patiëntengroepen in internationaal verband te bewerkstelligen. Vooral bij het onderzoek naar de oorzaak, diagnose en behandeling van zeldzame ziekten en de ontwikkeling van weesgeneesmiddelen<sup>9</sup> voor deze ziekten, is het vaak al zo dat de betreffende patiëntenorganisaties een wezenlijke rol spelen bij de opzet van het onderzoek. Vaak ook beheren zij de registers van patiënten die voor bepaald onderzoek in aanmerking zouden kunnen komen. Hierdoor is het voor onderzoekers weinig zinvol onderzoek op te zetten in deze gebieden zonder de medewerking van deze patiëntengroepen.

Patiëntenorganisaties zullen, als het gaat om *vermindering van het aantal dierproeven*, uit willen gaan van van tevoren vastgestelde doelstellingen zoals de reductie van het aantal proefdieren uitgedrukt in een bepaald percentage per decennium, een internationale validering van alternatieven, inpassing in educatietrajecten en dergelijke om zo de implementatie te bevorderen. Het is opvallend dat dergelijke doelstellingen tot nu toe ontbroken lijken te hebben in de opzet van het Nederlandse beleid rond alternatieven voor dierproeven. Uit het evaluatierapport 'Dierproeven begrensd' kan de conclusie worden getrokken dat het aanbeveling verdient een studie te verrichten naar de 'impact' van de resultaten van onderzoek naar vermindering, vervanging en verfijning van dierproeven in de afgelopen 20 jaar (ZonMW 2005). Die aanbeveling lijkt in het kader van deze tweede NVDEC bundel over alternatieven voor proefdieren ook voor de toekomst op zijn

9 Geneesmiddelen die bij een zeldzame ziekte worden toegepast en waar dus slechts een kleine vraag naar bestaat. De noodzaak voor deze middelen is er bij de individuele patiënt echter niet minder om.

plaats. Door het vaststellen van tevoren vaststaande doelstellingen kunnen afspraken gemaakt worden tussen wetenschappers, financiers, dierenbeschermers en patiënten, die voor een ieder – de maatschappij – transparant en toegankelijk moeten zijn.

Een andere aanbeveling is tijdens het laatste internationale congres over alternatieven voor dierproeven in Berlijn (augustus 2005) gedaan door de Belgische proefdierdeskundige Rogiers.<sup>10</sup> Zij stelde tijdens een van de sessies dat het niveau van de wetenschappers die werkzaam zijn op het terrein van het *onderzoek naar alternatieven* verbeterd zou moeten worden. Volgens haar moet voor de toekomst dit onderzoeksveld aantrekkelijker gemaakt worden om zo topwetenschappers uit andere wetenschapsdisciplines aan te trekken zich bezig te houden met dit onderwerp en ze vervolgens ook te behouden. Die laatste opmerking valt eveneens te lezen in het hierboven besproken evaluatierapport ‘Dierproeven begrensd’.

Voorwaarde voor betrokkenheid van de patiëntenbeweging is wel dat vooraf ook erkenning bestaat over nut en noodzaak van dierproeven in die situatie waar alternatieven niet of nog niet beschikbaar zijn. Een geluid dat recent ook vanuit de wereld van de dierenbeschermers zelf is gekomen. In een artikel in de NRC Handelsblad van het oud-bestuurslid van de Sophia-Vereeniging tot Bescherming van Dieren mevrouw Netty van Lookeren Campagne schrijft zij: “ik vind het alleen zo jammer en ook onverstandig, als dierenbeschermingsorganisaties zich uitsluitend beperken tot het zich afzetten tégen de proeven”.<sup>11</sup> Zij pleit voor het leggen van goede contacten van dierenbeschermers met onderzoekers, in een sfeer van wederzijds respect en zij noemt dan als voorbeeld het Deense farmaceutische bedrijf Novo Nordisk waar dierenbeschermers, proefdierdeskundigen en management met succes samenwerken. In een dergelijke samenwerking kan de openheid gecreëerd worden, die nu wel gevraagd wordt maar moeilijk gehonoreerd kan worden wanneer dit inhoudt dat instituten of onderzoekers direct fysiek bedreigd worden. Openheid is niet iets wat zomaar ontstaat, er moet een klimaat voor zijn. De patiëntenbeweging is zeker bereid daaraan haar bijdrage te leveren, want zij heeft veel te winnen bij maatschappelijke consensus over proefdieronderzoek.

10 Prof. dr. V. Rogiers (persoonlijke mededeling) 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Berlijn, August 21 – 25, 2005.

11 Van Lookeren Campagne N. Tactiek van dierenfront moet veranderen. NRC Handelsblad, 12 september 2005.

## **Referenties**

- Guerrini A. (2003) *Experimenting with Humans and Animals*. Baltimore: The John Hopkins University Press
- Kievits, F. & Adriaanse, M.T (2006). Gevaarlijk antilichaam. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 150(15): 872.
- Smit C. (2005) Transgene dieren en het patiëntenbelang. *Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij*, 24(2): 29-35.
- Rozendaal S. (2006) *Het is mijn lijf. Een nieuwe revolutie: Patient Power*. Soesterberg: Aspekt.
- ZonMW (2004) *Dierproeven begrensd, evaluatie van het programma Alternatieven voor Dierproeven*. Den Haag: ZonMw

# Dierproeven binnen de farmaceutische industrie: hoe zit het met Organon?

*Gerrit-Jan Wennink*

Jaarlijks worden in Nederland ongeveer 630.000 dierproeven verricht. 45 procent van het totaal wordt verricht voor de ontwikkeling, productie, controle of ijking van sera, entstoffen en geneesmiddelen ten behoeve van mens en dier<sup>1</sup> (VWA, 2004). Onder een dierproef wordt verstaan elk experiment voor een bij de wet aangegeven doel, waarvan het dier ongemak kan ondervinden.

Ook bij Organon, een business unit van Akzo Nobel, worden dierproeven voor bovenstaande doeleinden uitgevoerd. Organon is het grootste Nederlandse innovatieve farmaceutisch bedrijf met onderzoekscentra in Nederland, Schotland, Frankrijk, Duitsland en de Verenigde Staten. Organon ontwikkelt en produceert receptplichtige geneesmiddelen – middelen die alleen door een arts mogen worden voorgeschreven - op het gebied van de fertiliteit, gynaecologie, anesthesie en neurowetenschappen. Daarnaast doet Organon onderzoek op het gebied van immunologie en oncologie. Organons producten worden in meer dan 100 landen op de markt gebracht en het bedrijf heeft wereldwijd ruim 14.000 medewerkers in dienst.

In dit artikel wordt nader ingegaan op het hoe en waarom van dierproeven bij Organon en de inspanningen die het bedrijf levert op het gebied van de ontwikkelingen van alternatieven voor dierproeven.

## **De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen**

De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een langdurig proces. Eerst zal moeten worden vastgesteld waardoor bepaalde ziekten worden veroorzaakt. Daarbij wordt ook gezocht naar mogelijke aangrijpingspunten voor een geneesmiddel. Vervolgens moet er een stof worden gevonden die via dit aangrijpingspunt de ziekte kan bestrijden. In feite zoeken we naar een sleutel die in een bepaald slot past waarbij de sleutel het nieuwe genees-

1 VWA (2006) Zodoende. Jaaroverzicht 2004. Voedsel en warenautoriteit (VWA) Den Haag. [http://www2.vwa.nl/portal/page?\\_pageid=35,1554101&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&p\\_file\\_id=11326](http://www2.vwa.nl/portal/page?_pageid=35,1554101&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_file_id=11326)

middel is en het slot het aangrijpingspunt van de betreffende ziekte. Niet alleen moet het nieuwe geneesmiddel werkzaam zijn, het moet ook veilig zijn. Of een nieuw geneesmiddel ook daadwerkelijk over de gewenste kwaliteiten beschikt, blijkt pas na (langdurig) onderzoek in grote aantallen patiënten.

Nationale en internationale wetgeving schrijft echter voor dat het nieuwe middel pas bij mensen mag worden toegepast nadat het middel op dieren is getest. Als uit (kortdurend) onderzoek met proefdieren blijkt dat het middel veilig is, wordt het middel in eerste instantie in gezonde vrijwilligers toegepast (Fase I van het klinisch onderzoek). In de volgende fasen van het onderzoek (Fase II en Fase III) wordt in kleinere en later ook in grotere groepen patiënten gekeken of het middel werkzaam en ook bij patiënten veilig is. Voorafgaand aan en afgestemd op deze fasen in het onderzoek wordt het middel gedurende langere tijd aan proefdieren toegediend. Soms krijgen knaagdieren een middel twee jaar toegediend om uit te sluiten dat het middel op de wat langere termijn kanker kan veroorzaken.

Nadat alle studies in mens en dier zijn afgerond kan het nieuwe geneesmiddel voor registratie worden aangeboden. Over het algemeen zijn dan al twaalf jaar verstreken!

Overigens halen vele nieuwe geneesmiddelen de eindstreep niet door de strenge eisen die aan een nieuw middel worden gesteld. Van de 20.000 geïsoleerde stoffen wordt gemiddeld slechts één stof daadwerkelijk op de markt gebracht. Het is niet zo dat al deze 20.000 stoffen in proefdieren worden getest. De meeste vallen al af na computeronderzoek en onderzoek op cellen (zie ook de bijdragen van Schoonen & Horbach, Ridder en Groothuis & Van der Valk in deze bundel).

### **Dierproeven bij Organon**

Helaas zijn voor de ontwikkeling en productie van geneesmiddelen dierproeven noodzakelijk. Wel proberen onderzoeksinstituten en het bedrijfsleven het aantal dierproeven zoveel mogelijk te beperken. Naast ethische factoren spelen hierbij ook economische motieven een rol. Dierexperimenten zijn duur; niet alleen dient fors te worden geïnvesteerd in gebouwen waarin proefdieren worden gehuisvest, maar ook de verzorging is een aanzienlijke kostenpost. Verder is het wettelijk voorgeschreven de veiligheid en werkzaamheid in proefdieren te testen voordat het middel aan de mens mag worden toegediend. Het zou echter te gemakkelijk zijn je als bedrijf achter dit laatste te verschuilen. Organon vindt dat het niet aanvaardbaar is mid-

delen aan mensen toe te dienen zonder kennis te hebben van de veiligheid van het betreffende geneesmiddel. Natuurlijk kan veel onderzoek worden uitgevoerd met behulp van cellen die buiten het lichaam worden gekweekt (*in vitro* onderzoek) en met computermodellen. Maar het is (nog) niet mogelijk om een nieuw geneesmiddel zonder dierproeven (*in vivo* onderzoek) te ontwikkelen. In de latere fasen van het onderzoek kan namelijk het ingewikkelde biologische systeem van de mens met onze huidige kennis alleen worden nagebootst in een proefdier. Dat het gebruik van gekweekte cellen en computers heeft bijgedragen aan een aanzienlijke vermindering van het aantal proefdieren blijkt uit de volgende cijfers. Werden in de jaren zeventig nog ongeveer 295.000 dierproeven uitgevoerd bij Organon in Nederland, in 2005 was dit aantal gedaald tot minder dan 65.000. Hierbij moet nog worden aangetekend dat de onderzoeksactiviteiten in dezelfde periode aanzienlijk zijn toegenomen.

Bij Organon in Nederland is 54 procent van het aantal uitgevoerde dierproeven wettelijk voorgeschreven. Het betreft hier onderzoek ten behoeve van de vrijgifte van (hormonale) producten en veiligheidsonderzoek. De overige dierexperimenten omvatten het onderzoek naar nieuwe aangrijpingspunten voor geneesmiddelen en het onderzoek naar de werking ervan. In dit laatste geval worden nieuwe geneesmiddelen pas in proefdieren getest nadat *in vitro* onderzoek en computermodellen hebben aangetoond dat van het betreffende middel een veilige en goede werking mag worden verwacht.

Het is voor een bedrijf als Organon belangrijk rekening te houden met de zorg van de maatschappij voor het gebruik en welzijn van proefdieren. Een groot deel van de bevolking staat uiterst terughoudend tegenover het gebruik van proefdieren, hoewel het merendeel dierexperimenteel onderzoek ten behoeve van nieuwe medicijnen aanvaardbaar vindt. Het blijkt wel dat de acceptatie afneemt naarmate het ongerief voor de betrokken dieren toeneemt. Het alleen naleven van de Wet op de dierproeven (Wod) volstaat als farmaceutisch bedrijf niet meer. Organon voert dan ook een beleid dat gericht is op openheid. Openheid moet worden gezien als het geven van inzicht in de wijze waarop dierproeven tot stand komen en worden uitgevoerd zonder dat bedrijfsgevoelige informatie ongewild aan de buitenwereld bekend wordt gemaakt. Zo is een brochure gemaakt waarin wordt uitgelegd waarom en hoe dierproeven bij Organon worden uitgevoerd. Deze brochure is vooral bedoeld voor middelbare scholieren en bezoekers om ze een andere kijk te geven op dierexperimenteel onderzoek.

Dit beleid past in de strategie van Akzo Nobel met betrekking tot Sociaal Verantwoord Ondernemen. Naast Organon maken ook de andere farmaceutische business units Intervet en Nobilon en de business units Chemicals en Coatings deel uit van Akzo Nobel. Beide laatstgenoemde business units voeren dierproeven uit in het kader de toelating van chemicaliën. Sociaal Verantwoord Ondernemen betekent winst maken, rekeninghoudend met het milieu en de mens. Voor dierproeven geldt hierbij dat deze als een noodzakelijk kwaad worden beschouwd. Dierproeven zijn nodig om onder andere nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen. Men dient echter wel verantwoording af te leggen aan het publiek en een daadwerkelijke inspanning te leveren om dierproeven te vervangen, te verminderen of te verfijnen (de 3 V's). Op dit moment worden plannen uitgewerkt om te komen tot een jaarverslag waarin wordt uitgelegd voor welke projecten proefdieren zijn gebruikt en welke inspanningen zijn verricht ten aanzien van de ontwikkeling van alternatieven.

De Wet op de dierproeven geldt voor Organon als richtlijn waarin wordt aangegeven wat minimaal noodzakelijk is om naar wettelijke maatstaven verantwoord dierproeven uit te voeren. Het spreekt voor zich dat elk bedrijf of instituut zich hieraan dient te houden. De interne standaarden die het bedrijf hanteert, gaan echter vaak verder dan die de wet voorschrijft. Zo staat onder meer in de 'Regeling Huisvesting en Verzorging Proefdieren' dat "in het dierverblijf bedding en verrijkingmateriaal, passend bij de diersoort, aanwezig moet zijn". Om duidelijkheid aan zowel onderzoeker als biotechnicus/dierverzorger te verschaffen, is een procedure uitgewerkt die per diersoort aangeeft welk type verrijkingmateriaal kan/moet worden gebruikt. Hiervan afwijken is alleen mogelijk indien de onderzoeker kan onderbouwen waarom een bepaald type kooiverrijking niet verenigbaar is met zijn of haar experiment.

Iedere dierproef wordt vooraf getoetst door de Dierexperimentencommissie (DEC) van Organon. Hierin hebben naast medewerkers ook deskundigen zitting (waaronder de voorzitter) die geen relatie met het bedrijf hebben. De toetsing vindt plaats op een drietal onderdelen; een wetenschappelijke toetsing, een proefdierkundige toetsing en de uiteindelijke afweging of het belang van de proef opweegt tegen het ongerief dat de dieren door de proef kunnen ondervinden. Pas nadat de DEC een positief advies heeft uitgebracht mag het experiment worden uitgevoerd. De proefdierdeskundige (een dierenarts of andere deskundige) houdt niet alleen toezicht op het welzijn van de proefdieren, maar geeft daarnaast gevraagd en onge-



vraagd advies aan de onderzoeker en bedrijfsleiding over de opzet en het beleid ten aanzien van dierproeven. Vanwege de omvang van het bedrijf en de aard van en het aantal dierproeven dat bij Organon wordt verricht, is gekozen voor de aanstelling van twee proefdierdeskundigen. Zo is verzekerd dat er te allen tijde een proefdierdeskundige aanwezig of bereikbaar is.

Niet alleen de onderzoekers vormen een belangrijke schakel in het dier-experimenteel onderzoek. De proefdierversorgers en biotechnici komen dagelijks met de dieren in aanraking. De wijze waarop zij de verzorging en behandeling uitvoeren, is van invloed op de uitkomst van experimenten. Het is dan ook noodzakelijk laatstgenoemden hierop te wijzen en ze de gelegenheid te bieden hun kennis en vaardigheid op peil te houden. Dit kan worden bereikt door een persoonlijk opleidingsplan op te stellen en in een database de ervaringen en vaardigheden per medewerker bij te houden. Bij- en nascholing kunnen zowel binnen het bedrijf alsook daarbuiten plaatsvinden.

### **Alternatieven voor dierproeven: Vervanging, Vermindering en Verfijning**

Elk instituut of bedrijf dat met proefdieren werkt heeft de morele plicht actief te zoeken naar methoden voor de *vervanging, vermindering of verfijning* van dierproeven (de 3 V's). Tot op heden wordt, niet alleen bij Organon, veel aandacht besteed aan de vervanging van dierproeven. Het is echter lang niet altijd mogelijk om dierproeven te vervangen. Daarom verdienen de andere 2 V's net zoveel aandacht. Vooral vervanging van dierproeven is een langdurig proces. Aangehouden dient te worden dat de alternatieve testmethode dezelfde resultaten oplevert als de dierproef. Bij experimenten ten behoeve van bijvoorbeeld de registratie van geneesmiddelen duurt het dan ook vaak lang voordat een alternatief mag worden gebruikt.

Hoewel Organon al lange tijd actief aan alternatieven werkt, is dit in het verleden niet altijd op een structurele manier gebeurd. Daarom is in 2003 een werkgroep in het leven geroepen met de opdracht een strategie uit te werken voor de uitvoering van dierexperimenten en de wijze waarop het onderzoek naar alternatieven dient plaats te vinden, het stimuleren van dit onderzoek en het maken van voorstellen voor de leiding ten aanzien van het toewijzen van gelden. Bij dit laatste wordt vooral gelet op de uitwerking van de alternatieve methode op vervanging, vermindering en/of verfijning en de kans dat het alternatief ook daadwerkelijk kan worden ingezet. De werkgroep heeft een internationaal karakter en wordt gevormd door medewerkers afkomstig uit binnen- en buitenland, die op een of andere manier

met dierexperimenten te maken hebben. De samenstelling moet garanderen dat het onderzoek beter wordt gestroomlijnd en wereldwijde invoering van alternatieven (voor zover aan de orde) mogelijk maken.

Het brede publiek verwacht echter niet alleen een inspanningsverplichting, maar ook resultaten. Daarom worden als voorbeeld twee alternatieven beschreven die tot op heden, mede bij Organon, zijn ontwikkeld.

### *Voorbeeld 1.*

#### *Alternatief voor de vrijgifte van recombinant-FSH (Puregon®)*

Recombinant-FSH (rec-FSH) is de werkzame stof in Puregon®. Het wordt toegepast bij de behandeling van bepaalde vormen van onvruchtbaarheid. Vroeger werd het FSH uit de urine van zwangere vrouwen gewonnen, maar sinds 1996 wordt FSH geproduceerd met behulp van recombinant-DNA technieken. Hierbij worden stukjes DNA (basisbestanddeel van het erfelijke materiaal) van één organisme gebruikt om de erfelijke eigenschappen van een ander organisme te veranderen. Deze techniek wordt zowel in de voedselindustrie als bij de ontwikkeling van geneesmiddelen gebruikt. Een bekend voorbeeld van dit laatste is de productie van insuline ter behandeling van suikerziekte. Hierbij produceren micro-organismen, waarvan het erfelijke materiaal is veranderd door toevoeging van het DNA (dat verantwoordelijk is voor het maken van humane insuline) op grote schaal insuline. In het geval van rec-FSH is aan micro-organismen het FSH-DNA toegevoegd, waardoor deze micro-organismen FSH gaan produceren.

Voor alle geneesmiddelen geldt dat in vrijgiftetesten moet worden vastgesteld dat de werkzame bestanddelen in de juiste hoeveelheden in het te verkopen product aanwezig zijn. Zo ook voor Puregon®. Voor de meeste geneesmiddelen worden hiervoor laboratoriummethoden gebruikt waarbij geen proefdieren nodig zijn. Voor hormonen (FSH is het follikelstimulerend hormoon dat bij vrouwen zorgt voor de groei van eicellen) is dit anders. De activiteit van rec-FSH in de grondstof en het eindproduct wordt vastgesteld door een bepaalde hoeveelheid van de stof aan jonge vrouwelijke ratten toe te dienen. Uit de gewichtstoename van de eierstokken kan worden afgelezen hoeveel FSH-activiteit het monster bevat. Voor deze test, de Steelman-Pohley test genoemd, zijn relatief grote aantallen proefdieren nodig. Vervanging van dit diermodel door een in vitro model zou een belangrijke bijdrage leveren aan vermindering van het proefdiergebruik. Binnen Organon is men dan ook op zoek gegaan naar alternatieve testmethoden. Al gauw werd duidelijk dat er een verband bestond tussen de biologische werk-

zaamheid en de lading van FSH. Hoe zuurder het preparaat (meer negatief geladen), hoe langer de verblijftijd in het lichaam en dus hoe groter de werkzaamheid. De verschillen in lading zijn toe te schrijven aan een bepaalde suiker in de FSH-moleculen: siaalzuur. Hoe meer siaalzuur, hoe zuurder en dus actiever het FSH. De ladingsverschillen kunnen met een bepaalde techniek, Iso-Elektrische Focusering, worden aangetoond.

Simpel zou je zeggen. Toch heeft het ruim zeven jaar geduurd voordat de Iso-Elektrische Focusering als nieuwe methode voor de vrijgifte van rec-FSH door de autoriteiten werd geaccepteerd. Niet alleen de ontwikkeling van de nieuwe methode zelf kost namelijk tijd. Ook is het noodzakelijk de methode onafhankelijk en internationaal te testen. Je moet namelijk aantonen dat een nieuwe in vitro methode net zo goed en betrouwbaar is als de dierproef. Pas als de autoriteiten hiervan zijn overtuigd, kan toestemming worden gekregen om de nieuwe methode daadwerkelijk te gebruiken. Inmiddels is de toepassing van deze methode bij de vrijgifte van de grondstof rec-FSH goedgekeurd door een groot aantal autoriteiten in onder meer Canada, de Europese Unie, Nieuw-Zeeland, de Verenigde Staten en Zuid-Afrika.

### *Voorbeeld 2.*

#### *In vivo imaging system (IVIS)*

In vivo imaging is een techniek waarbij, zonder operatieve ingrepen aan het levende dier, de activiteit van nieuwe geneesmiddelen zichtbaar kan worden gemaakt. Voordat dieper in kan worden gegaan op deze techniek, is het noodzakelijk iets meer te vertellen over de werking van geneesmiddelen. Processen die zich in het lichaam afspelen zijn het gevolg van het aan- en uitschakelen van stukjes DNA. Deze stukjes DNA, genen genoemd, zijn verantwoordelijk voor de aanmaak van eiwitten die op hun beurt processen in het lichaam aansturen. Veel geneesmiddelen hebben hun aangrijpingspunt op deze genen; het ene geneesmiddel zal het gen 'aanzetten', terwijl andere het gen juist 'uitzetten'. Voor dit aan- en uitzetten van genen is een zogenaamde promotor nodig. Met behulp van het in vivo imaging system kan dit aan- en uitzetten zichtbaar worden gemaakt. Hiertoe wordt met behulp van recombinant-DNA- technieken in muizen het gen, dat zorgt voor de productie van het eiwit luciferase, gekoppeld aan de promotor van het te onderzoeken gen. Als dit gen door een geneesmiddel wordt aangezet, dan zal ook het luciferasegen actief worden. Wordt vervolgens aan het dier luciferine toegediend dan zal luciferase dit luciferine omzetten in licht. Dit ver-

schijnsel van lichtgeven komt overigens ook in de natuur voor, onder meer bij vuurvliegjes. De hoeveelheid licht kan met een zeer gevoelige camera worden gemeten en is een maat voor de activiteit van het geneesmiddel. Het grote voordeel van deze methode is dat hetzelfde dier gedurende langere tijd kan worden gevolgd en ieder dier zijn/haar eigen controle is. Dit verhoogt de nauwkeurigheid van de metingen en dus zijn voor dit onderzoek minder dieren nodig. Bovendien hoeven dieren niet voor het onderzoek te worden gedood.

Het *in vivo imaging* system wordt ook veel toegepast in kankeronderzoek. Door het luciferasegen in te bouwen in tumorcellen kunnen eventuele uitzaaiingen van tumoren goed in kaart worden gebracht. Dit is belangrijk om nieuwe behandelingsmethoden te kunnen ontwikkelen. Daarnaast kan met deze techniek ook worden onderzocht hoe bepaalde tumorcellen op een behandeling reageren

De grote uitdaging voor de farmaceutische industrie is om meer vernieuwende producten in kortere tijd op de markt te brengen tegen zo laag mogelijke kosten. Op dit moment bereikt van elk voor de ontwikkeling geselecteerd geneesmiddel slechts 5 procent de markt. Vijfennegentig procent van de stoffen sneuvelt dus tijdens het ontwikkelingsproces. Zoals eerder is gesteld, wordt geschat dat van de 20.000 kandidaat stoffen slechts één de eindstreep haalt. De belangrijkste redenen voor het sneuvelen van producten zijn onvoldoende werkzaamheid, ongewenste bijwerkingen, productieproblemen en het niet in voldoende mate beschikbaar komen van het geneesmiddel in het lichaam. Het zal dan ook geen verbazing wekken dat wordt gezocht naar mogelijkheden om in een vroege fase van de ontwikkeling van een geneesmiddel een betere voorspelling te kunnen doen van de werkzaamheid en veiligheid. Bijkomend voordeel is dat bij een vroege en betere herkenning van ongeschikte kandidaat geneesmiddelen wordt voorkomen dat proefdieren 'onnodig' worden gebruikt. Alleen die geneesmiddelen die kans hebben op een succesvolle ontwikkeling worden uiteindelijk in proefdieren getest. Binnen Organon werkt een onderzoeksteam aan een strategie dat gebruikmakend van moderne hulpmiddelen het ontwikkelingsproces van nieuwe geneesmiddelen verder moet verbeteren. Hierbij kan worden gedacht aan het gebruik van nieuwe technieken, waarbij een groot aantal stoffen tegelijkertijd *in vitro* kunnen worden gescreend op ongewenste eigenschappen als beschadiging van het DNA en belangrijke organen en eventuele schadelijke effecten op de ongeboren vrucht. Op deze manier wordt

geprobeerd ongeschikte middelen zo vroeg mogelijk te deselecteren (zie ook de bijdrage van Schoonen en Horbach over dit onderwerp).

### **Conclusies**

Dierproeven die helaas nog onontbeerlijk zijn bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, vereisen een zorgvuldige afweging en dienen met de grootste zorg te worden uitgevoerd. Pas dan verkrijgt men resultaten die betrouwbaar zijn en vertaling naar de mens mogelijk maken. Elk zich zelf respecterend bedrijf of instituut dat met proefdieren werkt, dient actief onderzoek te doen (al of niet in samenwerkingsverbanden) naar alternatieve testmethoden. Men dient zich hierbij niet alleen te richten op vervanging van dierproeven, maar ook te streven naar vermindering en verfijning.

# *In vitro* toxicologie als alternatief voor het gebruik van proefdieren

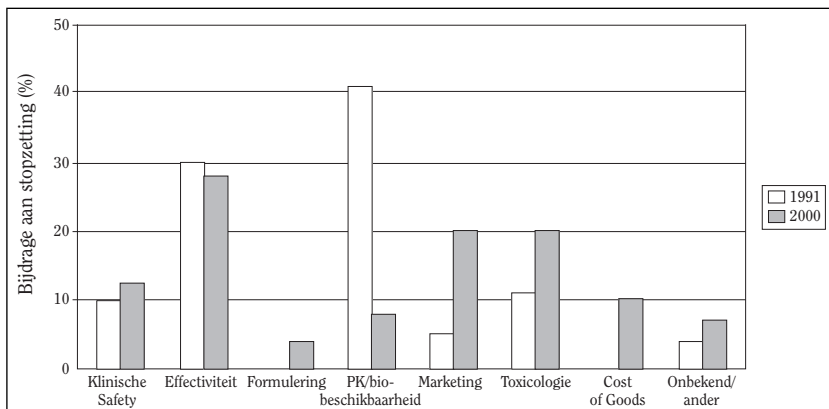
*Willem Schoonen en Jean Horbach*

De farmaceutische industrie staat voor de moeilijke taak om in steeds kortere tijd veilige geneesmiddelen (chemische en/of biologische stoffen) op de markt te brengen. Die markt wordt steeds competitiever omdat de gemaakte stoffen aan steeds hogere kwaliteits- en standaardnormen moeten voldoen. Naast de verkorte ontwikkelingstijd is ook de patentduur, waarmee deze investeringen kunnen worden terugverdiend, verkort. De introductie van combinatoriële chemie<sup>1</sup> heeft het synthetiseren van een groter aantal stoffen duidelijk versneld. Snellere biochemische en cellulaire meettechnieken hebben het analyseren van deze veelheid aan stoffen vereenvoudigd. Dit heeft geleid tot een grotere diversiteit aan mogelijke geneesmiddelkandidaten.

Het succes van deze nieuwe kandidaten in het huidige ontwikkelings-traject blijft echter relatief laag. Slechts 1 op de 20 stoffen haalt de markt. Een betere voorselectie van stoffen zal moeten leiden tot de optimalisatie van dit traject. Maar, naast verbeterde selectiecriteria van stoffen voor preklinische ontwikkeling is er ook een grote behoefte aan het opzetten van meetmethoden om stoffen in een veel vroeger stadium te kunnen rangschikken op grond van gewenste en ongewenste eigenschappen, zoals bio-beschikbaarheid, effectiviteit en toxiciteit. Deze zogenaamde testbatterijen moeten uiteindelijk resulteren in een verkleinde kans op het stopzetten van een stof in de klinische ontwikkeling.

Onderzoek naar de onderliggende oorzaken waarom stoffen in de klinische ontwikkeling falen, geeft aanwijzingen voor welke strategie gekozen moet worden om deze oorzaken weg te nemen en het proces van geneesmiddelontwikkeling te optimaliseren. Deze optimalisatie zal leiden tot een eerdere onderkenning van de kritische factoren in het ontwikkelingsproces. Door de relatief geringe beschikbaarheid van stof in dit vroege deel van het

1 Bij combinatoriële chemie worden op geautomatiseerde wijze uit verschillende chemische bouwstenen allerlei combinaties gemaakt die vervolgens, ook geautomatiseerd, worden onderzocht op hun bruikbaarheid, bijvoorbeeld op hun geneeskundige werking.



**Figuur 1.** Redenen voor de stopzetting van de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen (1991-2000). (PK=Farmacokinetiek. Bron: Kola en Landis, 2004.

ontwikkelingsproces zal de onderzoeker zich hierbij vooral richten op *in vitro* testen. Het gebruik van deze testen zal zeker leiden tot een vermindering van dierexperimenten in de preklinische ontwikkeling van stoffen met een geringe slaagkans om uiteindelijk de markt te halen.

Kola and Landis (2004) geven aan dat de redenen voor het stopzetten van de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel in de tijd kunnen veranderen (figuur 1). In 1991 viel 40% van de stoffen af door problemen met farmacokinetiek en biobeschikbaarheid. Door de toepassing van *in vitro* en *in vivo* testen naar farmacokinetiek en biobeschikbaarheid, was dit probleem in 2000 reeds gereduceerd tot 10%. In 2000 zorgden de klinische effectiviteit alsook de toxicologische en klinische veiligheid samen voor 30% van het stopzetten van een klinische ontwikkeling. De ervaring leert dat in de jaren tot 2006 hierin geen verandering is gekomen. Dit onveranderde percentage geeft al aan dat de huidige batterij aan toxiciteit- en effectiviteitstesten te kort schiet in zijn voorspelbaarheid voor de mens. De noodzaak voor de ontwikkeling van testen die beter vertaalbaar zijn naar de klinische situatie moge duidelijk zijn. De verdere ontwikkeling van testen voor het meten van klinische biomarkers (meetvariabelen) in bloed en/of urine die als vroeg signaal in de mens kunnen dienen voor het registreren van de effectiviteit en/of toxiciteit van een nieuw geneesmiddel kan een onderdeel zijn van deze optimalisatie.

Dit artikel schetst het gebruik van *in vitro* testen bij Organon om toxiciteit in een vroege fase van de ontwikkeling van een geneesmiddel in kaart te kunnen brengen.

### **Inventarisatie**

Bij een terugblik in de databestanden van Organon is gebleken dat van alle stoffen in de (pre)klinische ontwikkeling 40-50% is stopgezet door toxicologische problemen. De specifieke toxiciteit van deze stoffen is in kaart gebracht. Deze historische data zijn vervolgens vergeleken met openbaar beschikbare informatie van een vergelijkend onderzoek binnen Roche (tabel 1). Bij Roche kwam toxiciteit van de lever, de huid, het neuronale systeem en het cardiovasculaire systeem het meest frequent voor. Bij Organon, dat een andere samenstelling van de portfolio heeft, werd in 40% van de gevallen reproductieve toxiciteit en genotoxiciteit<sup>2</sup> waargenomen. De waargenomen (sub)acute, subchronische en chronische toxiciteit kon worden onderverdeeld in vier ongeveer even grote groepen gerelateerd aan organen of biologische systemen: de lever, het cardiovasculaire systeem, nieren en overige organen.

Toxiciteit is daarmee de belangrijkste redenen van het falen van de ontwikkeling van geneesmiddelen. Een betere kennis hiervan zal zeker kunnen leiden tot een verbetering van de testprocedures en daardoor een hogere slaagkans. Helaas kan slechts een klein deel van de oorzaken met een simpele “wel of niet toxisch”-benadering worden opgelost. Alleen voor genotoxiciteit en reproductieve toxiciteit is dit het geval. Andere vormen van toxiciteit kunnen hoogstens leiden tot een prioritering van stoffen op basis van de vraag welke stof een hogere kans heeft op een toxische werking. De stelling van Paracelsus blijft ook hier waar: “Indien een stof in voldoende hoge concentraties aan levende cellen of dieren wordt aangeboden, zal dit altijd tot toxiciteit leiden”. Om het plastisch uit te drukken: zelfs te veel water resulteert in de dood. Het is daarom van belang om de mate van toxische effecten te relateren aan de mate van de gewenste farmacologische effecten.

### **Genotoxiciteit**

Een onderzoeksgebied waar *in vitro* testen al lange tijd een belangrijke rol spelen is genotoxiciteit. Wanneer een stof positief wordt bevonden in een

2 Respectievelijk toxiciteit effecten op de voortplanting en op erfelijk materiaal.



*Tabel 1. Procentuele bijdrage van verschillende vormen van toxiciteit in het geneesmiddelenontwikkelingsproces*

| Oorzaak toxiciteit <sup>3</sup>  | Roche | Organon |
|----------------------------------|-------|---------|
| Lever                            | 20    |         |
| Cardiovasculair systeem          | 16    |         |
| Huid                             | 10    |         |
| Neuronaal                        | 10    |         |
| Genotoxiciteit/carcinogeniciteit | 6     | 20      |
| Nier                             | 4     |         |
| Maag- en darmstelsel             | 4     |         |
| Reproductieve toxiciteit         | 2     | 20      |
| (Sub)acute toxiciteit            |       | 20      |
| Subchronische toxiciteit         |       | 24      |
| Chronische toxiciteit            |       | 4       |

genotoxiciteitstest, dan leidt dit veelal tot het stoppen van de verdere ontwikkeling van deze stof. Om stoffen te kunnen screenen op mutageniteit (stofgerelateerde veranderingen in de genetische code), werd in het verleden de “pilot Ames” test<sup>4</sup> gebruikt in het latere deel van de selectiefase. Voor deze test was 25-40 mg stof noodzakelijk. Per week konden slechts 2-3 stoffen worden geanalyseerd. Door de beschikbaarheid van snelle testen met reporter genen<sup>5</sup>, te weten luciferase, galactosidase of alkalische fosfatase, zijn de benodigde hoeveelheden van de stof voor zo een test tot 1 à 5 mg gereduceerd en kunnen 16 tot 32 stoffen gelijktijdig worden getest. Het introduceren van dit soort snelle mutageniteitstesten, als alternatief voor de Ames test, in de vroege fase van het geneesmiddelenonderzoek heeft een enorm voordeel opgeleverd. Mutagene stoffen kunnen nu vroegtijdig worden uitgesloten en dierproeven met deze stoffen kunnen worden voorkomen. Een andere mogelijkheid die zich hierbij voordeed, was dat potentieel mutagene verbindingen chemisch konden worden aangepast om deze negatieve eigenschap te verwijderen met behoud van de positieve farmacologische stoffeigenschappen.

- 3 Genotoxiciteit omvat zowel mutageniteit (kleine veranderingen in de DNA sequentie) als clastogeniteit (structurele veranderingen in de chromosomen). (Sub)acute, subchronische en chronische toxiciteit worden gedefinieerd door de duur van blootstelling aan de stof. Bij (sub)acute toxiciteit is dit één week of minder; subchronische toxiciteit 13 weken of minder; chronische toxiciteit langer dan 13 weken.
- 4 De pilot Ames test is een aangepaste vorm van de Ames test, een door de regelgevende autoriteiten verplicht gestelde mutageniteitstest.
- 5 zoals de VITotox-assay of GreenScreen GC.

Een ander voorbeeld waarbij winst kan worden behaald is een test op clastogeniteit<sup>6</sup> (chromosoomafwijkingen). Deze testen op clastogeniteit zijn arbeidsintensief en daardoor niet geschikt om in de vroege onderzoeksfase te worden toegepast. Omdat een positieve clastogeniteitstest meestal het einde van een stof betekent, is er – onder andere om proefdieren te besparen – een dringende behoefte aan een goed alternatief in de vroege onderzoeksfase. Alternatieven die specifieke chromosomale afwijkingen kunnen aantonen, zijn al beschikbaar maar vereisen nog steeds een arbeidsintensieve waarneming door microscopen.<sup>7</sup> Verdergaande ontwikkeling op het gebied van de digitale beeldverwerking zal nodig zijn om deze alternatieven op een effectieve wijze in het vroege ontwikkelingstraject in te kunnen zetten.

### **Reproductieve toxiciteit**

Vroege informatie over de reproductieve toxiciteit van stoffen is eveneens essentieel voor het proces van geneesmiddelenontwikkeling. Kostbare *in vivo* testen in konijnen en ratten (1500-2000 mensuren per test) voor het vaststellen van reproductieve toxiciteit zijn wettelijk verplicht voor elk potentieel nieuw geneesmiddel dat gebruikt kan gaan worden bij vrouwen in de vruchtbare leeftijd. Deze uitermate belangrijke testen worden standaard pas laat in de ontwikkeling van een geneesmiddel uitgevoerd. Dit betekent dat al flinke investeringen zijn gedaan in (pre)klinische ontwikkeling alvorens besloten wordt dat een stof op reproductieve toxiciteit getest wordt. Afhankelijk van de chemische en farmaceutische klasse is de kans van falen in de reproductieve toxiciteitstesten met ongeveer 20% relatief hoog (zie tabel 1). In de afgelopen jaren is er daarom relatief veel energie gestoken in de ontwikkeling van eenvoudige, goedkope en snelle *in vitro* testen om de reproductieve toxiciteit te kunnen voorspellen. Aanvankelijk was het doel testen te ontwikkelen die de klassieke *in vivo* testen zouden kunnen vervangen. Echter, normale embryonale ontwikkeling blijkt te complex te zijn om in al zijn facetten in één of meerdere *in vitro* modellen te omvatten. De voorspellende waarde voor een vroege screeningsassay hoeft echter niet altijd

6 Binnen het standaard preklinische pakket zijn er twee clastogeniteitstesten opgenomen, de (in vitro) chromosoomaberratietest en de (in vivo) micronucleus-test (ICH Guideline S2B). In de eerste test worden chromosoomparen bekeken en wordt er gescoord op abnormaliteiten, zoals cross-over, chromosomale uitwisseling tussen niet chromosoomparen, etc. In de tweede test wordt onderzocht of naast de hoofdkern er meerdere kleine DNA stukjes of kernstukjes te identificeren zijn, de zogenaamde micronuclei.

7 bijvoorbeeld het gebruik van fluorescente antilichamen en een kleuring van het DNA micronuclei.

95-100% te zijn. Met een voorspellende waarde van 70-80% zou al veel winst in de voorselectie van stoffen behaald kunnen worden, zowel op het gebruik van proefdieren als op de slaagkans van deze stoffen in de klinische ontwikkeling. Daarom heeft het ECVAM<sup>8</sup> onlangs een uitgebreide validatiestudie gedaan van de drie meest gebruikte *in vitro* testen voor reproductieve toxiciteit (Genschow et al, 2002).<sup>9</sup> Een verslag van deze validatie is vrijgegeven en toont aan dat deze testen een redelijk goede voorspelbaarheid, gevoeligheid, specificiteit en selectiviteit hebben.

Een andere benadering is te kijken naar mogelijke mechanismen van reproductieve toxiciteit. Zo is van schildklierhormonen en hun receptoren bekend dat zij in de ontwikkeling van kikkers en padden een belangrijke rol vervullen bij het afsterven van de staart. Ook bij de ontwikkeling van het menselijke embryo spelen deze hormonen en receptoren een rol. De softenon-affaire is een duidelijk voorbeeld van schildklier-gerelateerde reproductieve toxiciteit bij de mens.<sup>10</sup> Ook zijn er verschillende aanwijzingen dat vitamine A betrokken is bij de embryonale ontwikkeling. Spina bifida (een embryonale afwijking waarbij de neurale buis op de rug niet goed gesloten wordt) kan worden veroorzaakt door te lage concentraties van vitamine A. In onder meer een publicatie van Elmazar en Nau (2004) is er een relatie gelegd tussen binding van stoffen aan vitamine A receptoren en een aantal embryonale afwijkingen. Een dergelijke relatie is ook voor een aantal neurotransmitters<sup>11</sup> aangetoond. Indien deze problematiek op tijd wordt onderkend, kunnen de juiste *in vitro* testen vroeg in de ontwikkeling worden ingezet om deze potentieel toxische stoffen te identificeren. Het blijft belangrijk zich hierbij te realiseren dat de waargenomen toxische nevenwerking het gevolg kan zijn van een normaal fysiologisch proces dat bij volwassenen juist moet optreden.

### **Acute toxiciteit**

Een lichaamsvreemde stof kan op verschillende manieren de normale cellulaire functie ontregelen. Bij een acute reactie kan dit gebeuren door het

8 Europees Centrum voor de Validatie van Alternatieve Methoden.

9 De drie geëvalueerde testen waren de whole-embryo-culture, de micromass test en de embryonale stamcel test.

10 Softenon is een geneesmiddel dat eind jaren vijftig als slaapmiddel en als middel tegen ochtend-misselijkheid op de markt werd gebracht. Na een aantal jaren bleek dat het bij baby's ernstige aangeboren afwijkingen veroorzaakte als de moeder het gedurende een bepaalde periode van de zwangerschap had gebruikt.

11 Een neurotransmitter is een molecuul dat wordt gebruikt voor de signaaloverdracht tussen zenuwcellen (neuronen) in het zenuwstelsel.

aantasten van basale mechanismen als energiemetabolisme, elektrische ladingsoverdracht, eiwitproductie en eiwituitscheiding. Verder kan de organisatie van het celskelet en de membraanintegriteit worden aangetast. Deze algemene cellulaire toxiciteit kan in elk willekeurig celtypen worden vastgesteld, maar weefsel- en/of orgaanspecifieke toxiciteit moet vaak bestudeerd worden in meer specifieke cellijnen, zoals primaire cellen (afkomstig van bepaalde organen of weefsels) of in weefselplakjes.

Om deze typen van acute toxiciteit te bestuderen zijn in verschillende laboratoria eenvoudige testen opgezet die snel resultaten opleveren en makkelijk interpreteerbaar zijn. Omdat meerdere fysiologische processen aanleiding kunnen geven tot cellulaire toxiciteit is het echter raadzaam een combinatie van testen op te zetten; testen, die celdood als eindpunt hebben en testen die een meer mechanistisch eindpunt hebben. Een voorbeeld is het door het ECVAM opgezette MEIC-programma<sup>12</sup> dat als resultaat heeft gehad dat de bruikbaarheid van meerdere cellijnen voor het bepalen van cellulaire toxiciteit algemeen is aanvaard. Bij Organon worden bijvoorbeeld verschillende gevalideerde cellulaire toxiciteitsbepalingen nu parallel uitgevoerd<sup>13</sup>. De resultaten van de vergelijking van 100 referentiestoffen laat zien dat er in de testresultaten een hoge mate van overeenstemming bestaat tussen de verschillende cellijnen. Met behulp van deze testen kunnen 40 stoffen per week worden gemeten en is slechts 1 à 5 mg stof nodig. Om de toxische effecten van (reactieve) metabolieten (afbraakproducten van vreemde stoffen) te kunnen bestuderen, moeten deze testen mogelijk verder worden verfijnd, aangezien de bij metabolisme betrokken enzymen waarschijnlijk afwezig of zeer weinig actief zijn in de gebruikte cellijnen.

### **(Sub-)chronische toxiciteit**

Het probleem van de (sub-)chronische toxiciteit in de ontwikkeling van geneesmiddelen moet niet onderschat worden. Van alle stoffen die in de ontwikkeling sneuvelen om redenen van toxiciteit worden er rond de 28% gestopt op grond van (sub-)chronische toxiciteit (zie ook tabel 1). De vraag is of we in staat zullen zijn de (sub-)chronische toxiciteit te voorspellen in

12 De MEIC (Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity) studie is een internationaal programma om de relevantie en betrouwbaarheid van *in vitro* testen te evalueren m.b.t. een voorspelling van acute toxiciteit.

13 Deze testen omvatten het meten van de cellulaire activiteit, DNA proliferatie, productie van reactieve zuurstofradicalen, de membraanintegriteit en glutathiondepletie (een indicator voor reactieve metabolieten in de cel) met de cellijnen HepG2, ECC-1, HeLa en CHO.

de vroege ontwikkeling van geneesmiddelen met behulp van korte analyses en eenvoudige *in vitro* systemen. (Sub-)chronische toxiciteit wordt pas zichtbaar na langdurige blootstelling van een organisme aan een bepaalde stof en is in de meeste gevallen het gevolg van een aantal complexe factoren en niet het resultaat van een enkel mechanisme. De verbanden tussen verschillende organen maar ook secundaire toxiciteitsproblemen, kunnen daarom op dit moment nog niet worden afgedekt met *in vitro* celkweek. In een celkweek ontbreken de interacties tussen verschillende organen. Door deze biologische complexiteit van (sub-)chronische toxiciteit zal het extreem moeilijk worden om de geneesmiddelenontwikkeling zonder proefdieren te laten plaatsvinden. In het bijzonder voor geheel nieuwe verbindingen waarvan het doelorgaan en mechanisme van toxiciteit onbekend is, zal dit probleem daarom vooralsnog blijven bestaan. De ontwikkeling van (toxico-)genomics (zie ook de bijdrage van Van Boxel in deze bundel), maar ook van proteomics en van metabolomics biedt de mogelijkheid om meer grip te krijgen op het mechanisme van toxiciteit. Uiteindelijk kan dit leiden tot de ontwikkeling van meer relevante en voorspellende modellen voor (sub-)chronische toxiciteit.

### **Conclusie: alternatieven en preklinische ontwikkeling**

Er is een groot aantal testen voor de *in vitro* toxicologie beschikbaar. Desondanks blijft het gebruik van deze testen in de reguliere toxicologie zeer beperkt. De hoofdreden is dat in de regelgeving de veiligheid van het geneesmiddel voor de patiënt een grote rol speelt en dat men de huidige (merendeels *in vivo*) methoden voor het vaststellen van toxiciteit hiervoor als het meest relevant ziet. De voorkeur voor de huidige methoden is gebaseerd op een grote ervaring met deze testen en de beschikbaarheid van grote databestanden. Alternatieve methoden zullen alleen in staat zijn de noodzakelijk geachte studies in de huidige regelgeving te vervangen wanneer aangetoond wordt dat ze een goed voorspellend model zijn voor de biologische complexiteit *in vivo*. Ondanks deze problemen kunnen *in vitro* testen een belangrijke rol spelen in de preklinische ontwikkeling. Dit geldt met name, indien binnen een klasse van verbindingen een specifiek mechanisme van toxiciteit wordt gevonden, of als de *in vitro* test gebruikt kan worden om de gevonden toxiciteit in een van de diersoorten beter te begrijpen en aldus de relevantie voor de mens beter te kunnen interpreteren.

*In vitro* alternatieven kunnen van belang zijn in het vroegste stadium van stofontwikkeling om de moleculaire structuur te optimaliseren. *In vitro*

testen kunnen tevens helpen stoffen te selecteren op basis van historische en cruciale tekortkomingen van eerdere kandidaten. Maar ook in dit geval draait alles weer om het motto van acceptatie. Aangezien de meeste testen (met uitzondering van de genotoxiciteit en reproductieve toxiciteit) alleen een volgorde in de mate van toxiciteit kunnen aangeven en niet tot selectie of deselectie zullen leiden, is het van belang om de onderlinge relatie tussen de verschillende testen goed vast te stellen. Een goede afweging van de onderlinge waarden van de individuele testen is daarbij een vereiste. Met andere woorden, zolang het niet mogelijk zal zijn om op basis van één specifieke test een uitspraak te doen over het stopzetten van de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel, zal de vraag blijven bestaan, hoeveel negatieve uitkomsten er nodig zijn voor het stopzetten van het ontwikkelingsprogramma en hoe een gewogen oordeel tot stand kan komen. Om hier grip op te krijgen, zal op basis van deze testen een uitgebreid databestand opgebouwd moeten worden. Maar niet alleen de *in vitro* data zullen in dit databestand moeten worden verzameld, ook de resultaten van de *in vivo* experimenten met dezelfde stoffen alsook de informatie over het succes van deze stof in de verdere ontwikkeling. Alleen op deze wijze zullen we in staat zijn om de voorspellende waarde van *in vitro* testen voor het hele ontwikkelingstraject van geneesmiddelen op een objectieve wijze in kaart te brengen.

De vraag of het gebruik van *in vitro* testen tijdens de stofoptimalisatie het gebruik van het aantal proefdieren in preklinische ontwikkeling zal verminderen kan zondermeer bevestigend worden beantwoord. Het feit dat een aantal stoffen eerder afgeschoten zullen worden, zal zeker leiden tot een vermindering van dierexperimenten in de preklinische ontwikkeling en daarmee ook tot een verfijning van de dierexperimenten. Het gebruik van *in vitro* toxiciteitstesten zal de toxicoloog al vroeg in het ontwikkelingsproces additionele informatie verschaffen over mogelijke schadelijke neveneffecten. Hierdoor kan er een meer op de specifieke aspecten van de stof afgestemd toxiciteitprogramma dat vereist is in de regelgeving worden uitgevoerd. Dit zal dan automatisch kunnen resulteren in een vermindering van dierproeven.

De rol van *in vitro* toxicologie in het ontwikkelingsproces van geneesmiddelen zal dus een grote rol kunnen spelen bij de voorselectie van stoffen en als een verfijning van het proefdiergebruik in dit ontwikkelingsproces kunnen fungeren. Desondanks zullen *in vitro* toxicologen zich de uitspraak van Fry & George (2001) ter harte moeten blijven nemen, name-

lijk “De vraag die beantwoord dient te worden in de toekomst is niet ‘Wat moeten we doen met alle nieuwe tools die we tot onze beschikking hebben’, maar veel meer ‘Waar liggen de vragen en welke tools hebben we nodig om deze vragen te beantwoorden?’”.

## **Literatuur**

- Kola I. & Landis J. (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 711-715.
- ICH Guideline S2B (1997): Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing for Pharmaceuticals.
- Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Bremer S., Becker K., 2002, The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA – Alternatives to laboratory animals*, 30, 151-176.
- Elmazar M.M. & Nau H. (2004) Potentiation of teratogenic effects induced by coadministration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic retinoid receptor ligands. *Archives of Toxicology*, 78: 660-668.
- Fry J. & George E. (2001) In vitro toxicology in the light of new technologies. *ATLA – Alternatives to laboratory animals*, 29: 745-748.

# Onderzoek met menselijk weefsel: een humaan alternatief?

*Geny Groothuis en Jan van der Valk*

Veel biomedisch wetenschappelijk onderzoek is gericht op het vermeerderen van kennis over de fysiologie en pathologie van de mens om mogelijk daarmee de gezondheid en kwaliteit van leven te verbeteren. Hiervoor worden veelal proefdiermodellen gebruikt. Daarnaast wordt veel dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd ten behoeve van farmacologisch en toxicologisch onderzoek, om nieuwe geneesmiddelen te testen voor ze aan de mens worden toegediend. Over het algemeen berust dit proefdiergebruik op de bijna vanzelfsprekende aanname dat dierexperimenteel onderzoek waardevolle informatie kan geven voor de mens. Dit is gebaseerd op de gelijkheid van de anatomie, fysiologie en patho-fysiologie tussen verschillende zoogdierspecies en de mens. Vele facetten van dit onderzoek zouden wellicht met menselijk weefsel kunnen worden uitgevoerd. Het gebruik van menselijk weefsel voor wetenschappelijk onderzoek staat regelmatig in de belangstelling, met name omdat hierbij serieuze ethische vraagstukken aan de orde komen.

## **Tekortkomingen van dierproeven**

Aan dierproeven voor bovengenoemde onderzoeksdoelen kleven naast de algemene ethische bezwaren ook wetenschappelijke bezwaren. Op het wetenschappelijke vlak bestaan er problemen met de extrapolatie van de met dierexperimenten verkregen gegevens naar de mens. Weliswaar bezitten mens en proefdier veel overeenkomsten in hun fysiologie, op detailpunten kunnen grote verschillen aanwezig zijn. Deze verschillen kunnen een grote invloed hebben op bijvoorbeeld de werking van geneesmiddelen. Zo blijkt steeds vaker uit onderzoek dat de manier waarop de cellen in ons lichaam functioneren en geregeld worden, op belangrijke punten verschilt van vergelijkbare processen in dieren. Vooral op het gebied van onderzoek naar de veiligheid van geneesmiddelen of andere lichaamsvreemde stoffen die ons lichaam via voedsel of milieu binnenkomen, kunnen voorspellingen op basis van dierexperimenten leiden tot verkeerde conclusies. De verklaring hiervoor is de volgende: de natuurlijke reactie van het lichaam is om deze



lichaamsvreemde stoffen uit te scheiden, veelal nadat ze in het lichaam door enzymen zijn omgezet (gemetaboliseerd) in goed oplosbare afbraakproducten die kunnen worden uitgescheiden uit het lichaam. Meestal neemt na de enzymatische omzetting de giftigheid (toxiciteit) van de stof af, maar soms is juist het tegenovergestelde het geval en zijn de metabolieten juist toxischer dan de oorspronkelijke stof. En juist bij deze metabole processen zijn er veel verschillen tussen proefdieren en mensen.

Dierproeven zijn desondanks zeer belangrijk. Om een geneesmiddel op de markt te kunnen brengen is het bijvoorbeeld wettelijk voorgeschreven dat in twee proefdierspecies (in Nederland een knaagdier en een niet-knaagdier) de toxiciteit van het nieuwe middel is bepaald. Een groot deel van de nieuwe potentiële geneesmiddelen haalt de eindstreep niet vanwege onacceptabele eigenschappen zoals onvoldoende werking, slechte opname in de darmen, snelle verwijdering uit het lichaam of schadelijke bijwerkingen (toxiciteit). Het blijkt echter dat men dit niet altijd ontdekt tijdens de fase van proefdieronderzoek. Soms komt dit pas bij de eerste (klinische) proeven met mensen naar voren. Zelfs nadat een geneesmiddel succesvol alle klinische fasen heeft doorlopen moeten er nog relatief vaak middelen uit de markt gehaald worden wegens onverwachte bijwerkingen en/of interacties. Zo werden we in het voorjaar van 2006 opgeschrikt door het nieuws dat een aantal proefpersonen ernstig ziek werd tijdens een klinische proef van een nieuw geneesmiddel in Engeland.<sup>1</sup> Ook het middel Vioxx werd onlangs uit de handel genomen omdat er ernstige bijwerkingen optraden die in eerste instantie niet bij de testen naar voren waren gekomen.

Waarom gaat het ondanks al het onderzoek toch nog fout? Er zijn verschillende oorzaken aan te wijzen voor deze onverwachte bevindingen (Rulius, 1987; Forslund, 1997). Een daarvan is zoals gezegd het feit dat er belangrijke maar (nog) niet te voorspellen verschillen bestaan in de manier waarop proefdieren en mensen deze lichaamsvreemde stoffen verwerken en tot (schadelijke) metabolieten omzetten.

Naast deze wetenschappelijke tekortkoming zijn er ethische bezwaren aan het gebruik van dierproeven. Er is een toenemende druk van nationale en internationale overheden om het proefdiergebruik te verminderen en om alternatieven te gebruiken. De Nederlandse Wet op de dierproeven (Wod) is hier een duidelijk voorbeeld van. Hierin is bepaald dat een dierproef verboden is

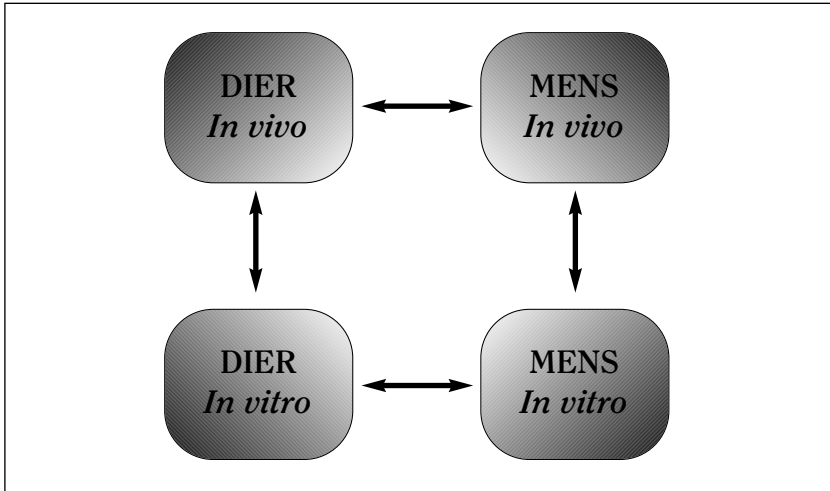
1 Hester van Santen. Wij schrikken al van allergie-reactie; Veel proefpersonen, maar weinig ongevallen in Nederland. NRC-Handelsblad 20 maart 2006.

als er goede alternatieven beschikbaar zijn. Op velerlei manieren wordt de ontwikkeling en toepassing van alternatieven voor dierproeven gestimuleerd.

### **Humaan weefsel als alternatief**

Een van de mogelijkheden om zowel aan de ethische als wetenschappelijke bezwaren tegen dierproeven tegemoet te komen is het doen van onderzoek aan humaan weefsel. Onderzoeken uitgevoerd door de Afdeling Proefdiervraagstukken (Cohen & De Cock Buning, 1996) en het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA) (Hauman, 2003; Meijer 1998) toonden aan dat het gebruik van humaan materiaal in het wetenschappelijk onderzoek het aantal dierexperimenten kan doen verminderen, en daarom als “alternatief voor dierproeven” bestempeld kan worden. Onderzoekers die humaan materiaal gebruiken gaven desgevraagd aan dat het gebruik van dit materiaal een goed alternatief kan zijn voor sommige dierproeven. Daarnaast zou het gebruik van menselijk materiaal de efficiëntie van het onderzoek kunnen verhogen doordat de extrapolatie van dier naar mens overbodig zou worden (Cohen & De Cock Buning, 1996). Daarentegen wordt de grotere variabiliteit tussen menselijke donoren in vergelijking met die tussen ingeteelde proefdieren als een bezwaar genoemd. Echter voor de ontwikkeling van kennis over het menselijk lichaam en de ontwikkeling van geneesmiddelen kan juist de kennis omtrent die variabiliteit van groot belang zijn. Het gebruik van humaan weefsel in het wetenschappelijk onderzoek is o.a. ook door ECVAM (het Europese centrum voor validatie van alternatieven, zie ook de bijdrage van Coecke elders in deze bundel) aangemerkt als een alternatief dat dierproeven in een aantal gebieden kan vervangen of verminderen (Anderson et al, 1998, 2001).

Humaan weefsel voor onderzoek kan weefsel zijn dat bij operaties wordt weggenomen om therapeutische (bijvoorbeeld om een tumor te verwijderen) of diagnostische redenen. Weefsel dat niet door de patholoog gebruikt hoeft te worden om de diagnose te stellen kan in dat geval voor wetenschappelijk onderzoek beschikbaar komen. Daarnaast komt er ook weefsel ter beschikking dat in principe voor transplantatie is afgestaan maar waarvoor om welke reden dan ook geen geschikte ontvanger kan worden gevonden of dat niet aan de kwaliteitseisen voor transplantatie voldoet. Dit weefsel mag dan alleen voor wetenschappelijk onderzoek gerelateerd aan transplantatiedoelinden gebruikt worden. Het spreekt voor zich dat in deze situatie het gebruik van dit menselijk materiaal voor transplantatie altijd een hogere prioriteit blijft houden dan het gebruik voor wetenschappelijk onderzoek.



*Figuur 1. De toepasbaarheid van menselijk in vitro weefselonderzoek vereist validering door onderzoek bij mensen. Vanwege de beperkte mogelijkheden hiervoor wordt daarbij teruggegrepen op validering door middel van een in vivo - in vitro vergelijking bij dieren.*

Daarnaast kan weefsel worden verkregen van overleden mensen die hiervoor tijdens hun leven toestemming hebben gegeven, maar waarbij geen sprake is van donatie voor transplantatie. In beperkte mate kan ook materiaal van vrijwilligers worden verkregen, denk daarbij aan bloed of huid.

Van groot belang voor de conclusies die uit onderzoek met humaan weefsel kunnen worden getrokken is de kwaliteit van het weefsel. De kwaliteit wordt sterk bepaald door de manier waarop het wordt uitgenomen en bewaard. Voor ieder type weefsel zal moeten worden vastgesteld of de nog aanwezige functies representatief zijn voor de functies in het complete levende organisme. Dit is voor het humane weefsel vaak moeilijk vast te stellen omdat *in vivo* experimenten niet mogelijk zijn. Daarom wordt vaak ook vergelijkend onderzoek met weefsel afkomstig van proefdieren uitgevoerd. De resultaten daarvan kunnen met behulp van *in vivo* dierproeven worden gevalideerd, waarna men door extrapolatie de waarde van het humane weefsel-experiment kan inschatten (zie figuur 1).

### **Beschikbaarheid van humaan weefsel**

Het zijn met name onderzoekers in een universitaire setting met een universitair ziekenhuis die door samenwerking met de medisch specialisten de beschikking kunnen hebben over menselijk materiaal, nadat toestemming

is verkregen van de patiënt en eventueel de Medisch Ethische Toetsingscommissie. Andere onderzoekers zijn echter aangewezen op materiaal dat kan worden verkregen via lokale weefselbanken of not-for-profit organisaties elders in de wereld (bijvoorbeeld in Groot Brittanië en de Verenigde Staten). Bij buitenlandse bronnen spelen echter hoge transportkosten en problemen met de preservatie en de kwaliteit van het materiaal een belemmerende rol.

In diverse onderzoeken (Cohen & De Cock Buning, 1996; Hauman, 2003; Meijer 1998) is vast komen te staan dat er een tekort is aan humaan weefsel, dat wil zeggen dat onderzoekers wel met humaan materiaal zouden willen werken maar vanwege de geringe beschikbaarheid dierproeven moeten blijven doen. Tegelijkertijd komt het in Nederland regelmatig voor dat menselijk materiaal voor onderzoek vrijkomt dat niet gebruikt wordt omdat de gevolgde toestemmingsprocedures hierin niet hebben voorzien, er geen coördinatie op nationaal niveau bestaat en omdat men te weinig bekend is met preservatietechnieken. Daarnaast wordt relatief weinig materiaal ter beschikking gesteld omdat verstrekkers niet of nauwelijks op de hoogte zijn van de ethische en wettelijke consequenties en de regelgeving op dit punt niet duidelijk is (Hauman, 2003).

### **Wettelijke regelingen**

In de Volkskrant van zaterdag 29 april 2006 wordt de hoogleraar medische ethiek Donnan Dickenson aangehaald die waarschuwt dat menselijk weefsel “big business” is. Niet alleen voor wetenschappelijk onderzoek maar met name ook in de biotechnologie is er veel vraag naar en toepassing voor menselijk weefsel. Juridisch gezien, zegt Dickenson, is het een niemandsland: ‘Niet iedereen beseft dat het menselijk lichaam handelswaar is’.<sup>2</sup> Om ongewenste praktijken te voorkomen, is regelgeving noodzakelijk. Voor wat betreft het wetenschappelijk onderzoek toont het onderzoek van het NCA aan dat de belangstelling voor menselijk materiaal groter is dan het aanbod (Hauman, 2003). Dit had o.a. te maken met het feit dat veel verstrekkers (behandelende artsen) onzeker waren over de juridische consequenties van het verstrekken van materiaal van hun patiënten voor wetenschappelijk onderzoek. Maar ook onderzoekers waren onzeker over de ethische aspecten van het doen van onderzoek aan menselijk materiaal. Het gebruik van menselijk materiaal kan inderdaad niet zo maar.

2 Aleid Truijens. Gruwelsprookje dat werkelijkheid wordt. De Volkskrant, 29 april 2006.

Wetenschappelijk onderzoek met menselijk lichaamsmateriaal is binnen Europa in slechts enkele landen vastgelegd in wettelijke regelingen, die onderling echter niet zijn geharmoniseerd. Bij transplantatieregelingen, zien we dat in sommige landen menselijk lichaamsmateriaal voor wetenschappelijk onderzoek gebruikt mag worden, tenzij de donor bezwaar heeft gemaakt (opt-out), terwijl in andere landen nadrukkelijk toestemming van de donor moet worden gevraagd (opt-in) (Anderson, 1998). Op internationaal niveau heeft de Convention on Human Rights and Biomedicine (Anon, 1997) in richtlijnen vastgelegd hoe men dient om te gaan met lichaamsmateriaal dat in de loop van een medische interventie uit het lichaam is verwijderd.

In Nederland regelen diverse wetten direct of indirect het gebruik van lichaamsmateriaal voor wetenschappelijk onderzoek. Organen die voor transplantatiedoeleinden zijn uitgenomen, maar daarvoor niet geschikt blijken, kunnen volgens de Wet op de orgaandonatie alleen voor transplantatiegericht onderzoek gebruikt worden. In sommige andere landen biedt het donorcodicil de mogelijkheid aan te geven of weefsel na overlijden mag worden gebruikt voor wetenschappelijke doeleinden. In Nederland heeft men ervoor gekozen dat niet op te nemen in het donorcodicil omdat men vreesde dat het aantal donoren dan zou teruglopen. In de Wet op de geneeskundige behandelingsovereenkomst is een regeling opgenomen die het mogelijk maakt dat “van het lichaam afgescheiden anonieme delen en stoffen” voor andere doeleinden, waaronder wetenschappelijke, gebruikt kunnen worden als daartegen geen bezwaar is gemaakt door de patiënt. Dan is er ook de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen, die regelt dat in die gevallen dat weefsel wordt afgenomen specifiek voor wetenschappelijke doeleinden het onderzoeksprotocol dient te worden goedgekeurd door een medisch-ethische toetsingscommissie. Volgens de Wet inzake bloedvoorziening kan bloed ook specifiek voor wetenschappelijke doeleinden worden afgestaan. De Wet op lijkbezorging bepaalt dat als de donor bij leven contact opneemt met een wetenschappelijk instituut, bijvoorbeeld een anatomisch instituut of de Hersenbank, het lichaam of delen daarvan na overlijden gebruikt kunnen worden voor onderzoek of onderwijs. Dit materiaal is echter niet altijd geschikt voor wetenschappelijk onderzoek waarbij vers, levend materiaal nodig is, omdat na de dood van de donor vele weefsels hun vitaliteit snel verliezen door gebrek aan zuurstof. Voor de onderzoeker die met vers weefsel moet werken is dus belangrijk dat informatie verstrekt wordt over hoe het weefsel werd afgenomen.

Er is een wet “Nader gebruik humaan materiaal” in voorbereiding dat het gebruik regelt voor wetenschappelijke doeleinden van menselijk materiaal dat voor een ander doeleinde is uitgenomen (diagnostiek, pathologie). Deze wet zal met name regelen hoe met de privacy van de donor zal moeten worden omgegaan. Vooruitlopend op de wet heeft de Federatie van Medisch Wetenschappelijk Verenigingen de Code Goed Gebruik opgesteld dat onder andere de toestemming, of geen bezwaar, van de donor regelt (Anon, 2002). De Code schrijft voor dat de eventuele donor op de hoogte dient te zijn dat afgenomen weefsel gebruikt kan worden voor wetenschappelijk onderzoek, en heeft aangegeven hiertegen geen bezwaar te hebben. Tevens dient de arts die het weefsel afneemt dit zodanig te coderen dat privacy van de donor is gewaarborgd. In het geval dat met het lichaamsmateriaal gegevens worden verstrekt die de donor kunnen identificeren, moet de donor worden geïnformeerd over de aard van het wetenschappelijk onderzoek dat met het lichaamsmateriaal zal worden uitgevoerd en moet deze daarvoor uitdrukkelijk toestemming hebben verleend (*informed consent*). Verder wordt bepaald dat voor het verstrekken van menselijk lichaamsmateriaal geen vergoeding mag worden gevraagd.

Echter, alle regelingen bij elkaar blijken een groot obstakel voor artsen en potentiële donoren te vormen omdat ze door het woud van huidige regelingen onzeker zijn over de juridische consequenties van de beschikbaarstelling van weefsels. Verder zijn de methoden om toestemming van de patiënt te vragen niet gestandaardiseerd, laat staan overal toegepast, en heerst er ook bij mogelijke donoren een zekere terughoudendheid omdat onduidelijk is wat de consequenties zijn wanneer wetenschappelijk onderzoek met zijn of haar lichaamsmateriaal zou worden uitgevoerd. Alleen huid, hersenmateriaal (Ravid & Swaab 1993) en bloedcomponenten worden met redelijke regelmaat verkregen o.a. door de activiteiten van gespecialiseerde weefselbanken (Meijer, 1998).

### **Humane weefselbanken**

Een werkgroep van experts op het gebied van wetenschappelijk onderzoek met menselijk materiaal is samen met het NCA aan de slag gegaan om de genoemde problemen met betrekking tot het gebruik van menselijk materiaal voor wetenschappelijk onderzoek te inventariseren en daar oplossingen voor aan te dragen. De werkgroep is tot de conclusie gekomen dat een nationale *not-for-profit* humane weefselbank de problemen voor een groot deel zou kunnen ondervangen. Zo'n weefselbank zou vraag en aanbod kun-

nen coördineren en zelfs weefsel kunnen verzamelen, bewerken, opslaan en onder onderzoekers verspreiden. Dergelijke weefselbanken zijn al enige jaren met succes actief in Engeland en functioneren daar met instemming van en onder toezicht van de overheid en de medisch-ethische commissies. De UK Human Tissue Bank (UKHTB) in Leicester (Orr & Trafford, 2004) en de Human Tissue Bank van het Peterborough District Hospital (Womack & Gray, 2000, zijn in Engeland al enige tijd als humane weefselbanken prominent actief bij het coördineren van vraag- en aanbod en het opslaan en bewerken van weefsel (Anderson et al., 2001). Beide weefselbanken leveren weefsel aan de farmaceutische industrie waar menselijk materiaal wordt gebruikt bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en het testen van de toxiciteit. De UKHTB levert ook materiaal aan universitaire wetenschappers voor fundamenteel en toegepast wetenschappelijk onderzoek. Het belang van deze weefselbank kan worden afgelezen uit het feit dat per jaar ca. 600 keer weefsel wordt geleverd en dat het aantal leveringen nog steeds toeneemt.

Ook in andere landen van de Europese gemeenschap zijn weefselbanken voor wetenschappelijk onderzoek opgestart. Daarnaast is onlangs een Europees Netwerk van weefselbanken (European Network of Research Tissue Banks) opgericht met als doel het coördineren en stimuleren van het verkrijgen en gebruiken van humaan weefsel voor wetenschappelijk onderzoek (Orr, 2002, 2005). Uit het eerdergenoemde onderzoek van het NCA (Meijer, 1998) kwam ook naar voren dat een groot deel van de geënquêteerde Nederlandse wetenschappers bereid waren samen te werken met zo'n weefselbank. De helft van de ondervraagden gaf aan dat een weefselbank het gemakkelijker zou maken humaan materiaal voor het wetenschappelijk onderzoek te (gaan) gebruiken. Een humane weefselbank zal dus een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan een toename van het gebruik van humaan weefsel en daardoor aan een vermindering van het proefdiergebruik.

In Nederland bestaan reeds een aantal weefselbanken; deze zijn primair gericht op transplantatiedoelinden. Op een aantal plaatsen worden tevens ook op kleinschalige wijze weefselcollecties onderhouden; deze zijn meestal direct gekoppeld aan onderzoek van individuele wetenschappers en vaak slecht bekend en/of toegankelijk voor onderzoekers buiten de directe kring van de "eigenaren". Slechts enkele weefselbanken profileren zich ook als bank die weefsel voor onderzoek levert: de Nederlandse Hersenbank (Ravid & Swaab, 1993) en de Tumorbank van de Erasmus Universiteit. Het verstrekte weefsel is echter geconserveerd, dus niet vers, en kan dus alleen voor

die onderzoeken gebruikt worden waar geen levende cellen voor nodig zijn. Voor veel onderzoek is het echter van belang dat de onderzoeker vers materiaal krijgt en over informatie beschikt hoe het weefsel is afgenomen. De voorgenumen humane weefselbank voor wetenschappelijk onderzoek is echter nog niet van de grond gekomen door gebrek aan sponsors.

## **Conclusie**

We kunnen concluderen dat menselijk weefsel goed gebruikt kan worden in het wetenschappelijk onderzoek en in een aantal gevallen dierexperimenteel onderzoek kan vervangen of verminderen en dus een humaan alternatief zou kunnen zijn. De vraag naar weefsel is echter groter dan het aanbod. Dit komt o.a. door praktische belemmeringen en door onzekerheid over de ethische en juridische consequenties. De Code Goed Gebruik (Anon, 2002) zou aan dit probleem tegemoet kunnen komen. Daarnaast zou een centrale weefselbank die vraag en aanbod met elkaar in contact brengt en daarbij zorg draagt voor alle ethische en juridische aspecten, de beschikbaarheid van humaan weefsel voor wetenschappelijk onderzoek kunnen faciliteren. Tenslotte blijkt er onderzoek nodig te zijn naar betere methoden om levend weefsel te bewaren (preserveren) waarbij de functies behouden blijven en de beschikbaarheid van weefsels verbetert.

## **Literatuur**

- Anderson, R., M. Balls, M.D. Burke, M. Cummings, D. Fehily, N. Gray, M.G. de Groot, H. Helin, C. Hunt, D. Jones, D. Price, L. Richert, R. Ravid, D. Shute, D. Sladowski, H. Stone, W. Thasler, J. Trafford, J. van der Valk, T. Weiss, C. Womack, and T. Ylikomi Anderson, R., et al. (2001) The establishment of human research tissue banking in the UK and several western European countries. The report and recommendations of ECVAM Workshop 44. *Alternatives To Laboratory Animals*, 29(2): 125-134.
- Anderson, R., O'Hare, M., Balls, M., Brady, M., Brahams, D., Burt, A., Chesne, C., Combes, R., Dennison, A., Garthoff, B., Hawksworth, G., Kalter, E., Lechat, A., Mayer, D., Rogiers, V., Sladowski, D., Southee, J., Trafford, J., van der Valk, J., van Zeller, A.M. Anderson R., et al. (1998) The Availability of Human Tissue for Biomedical Research: The Report and Recommendations of the ECVAM Workshop 32. *Alternatives To Laboratory Animals*, 26(6): 763-777.
- Anon (1997) Convention of the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on human rights and biomedicine, in Council of Europe, ETS No. 164. 1997. <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/Html/164.htm>
- Anon (2002) Code Goed Gebruik. [http://www.federa.org/DB\\_FILES/productie/general/1\\_82\\_308/CodeGoedGebruik.pdf](http://www.federa.org/DB_FILES/productie/general/1_82_308/CodeGoedGebruik.pdf)
- Cohen N.E. & De Cock Buning T. (1996) Humaan materiaal in onderzoek. Voorstel tot een alternatief voor dierproeven., in *Proefdier en wetenschap* 9. 1996. Uitgave van de afd. Dierproefvraagstukken, Leiden.



- Forslund K. (1997) Similarities and differences between animal species and man, with special reference to rheumatoid arthritis and diabetes mellitus. *ATLA*, 25: 183-185.
- Hauman J. (2003) Nederlandse Bemiddelingsbank voor Humaan Weefsel: een haalbaar alternatief., in NCA rapport. Rapport van het NCA, Utrecht.
- Meijer G.A.H. ((1998) Nader gebruik nader bekeken. Rapport van het NCA, Utrecht, in NCA rapport.
- Orr S. & J. Trafford J. (2004) The Establishment of the UK Human Tissue Bank. *Atlas de Radiologie Clinique de la Presse Medicale*, 32 (Suppl. 1): p51-55.
- Orr S., et al. (2005) Fourth meeting of the European Network of Research Tissue Banks - future strategy to increase collaborations in the supply of human tissue for biomedical research. *Cell Tissue Bank*, 6(2): 131-8.
- Orr, S., Alexandre, E., Clark, B. J., Combes, R., Fels, L.M., Gray, N., Jönsson-Rylander, A.-, Helin, H., Koistinen, J., Oinonen, T., Richert, L., Ravid, R., Salonen, J., Teesalu, T., Thasler, W., Trafford, J., van der Valk, J., von Versen, R., Weiss, T., Womack, C., Ylikomi, T. Orr S., et al. (2002) The establishment of a network of European human research tissue banks. *Cell and Tissue Banking*, 3(2): 133 - 137.
- Ravid R. & Swaab D.F. (1993) The Netherlands brain bank--a clinico-pathological link in aging and dementia research. *Journal of Neural Transmission Supplement*, 39: 143-153.
- Rulius H.W. (1987) Extrapolation from animals to man: predictions, pitfalls and perspectives. *Xenobiotica*, 1987. 17: 255-265.
- Womack C. & Gray N. (2000) Peterborough hospital has tissue bank on not for profit basis. *Bmj-British Medicakl Journal*, 321(7274): 1473.

# Dierproeven en 3 V methoden in de ontwikkeling en controle van vaccins

*Coenraad Hendriksen*

In 1884 publiceerde de Duitse microbioloog Robert Koch 'Die Aethologie und die Bekämpfung der Tuberkulose'; een standaardwerk over de etiologie van tuberculose. Wat het boek ook nu nog actueel maakt zijn de criteria die Koch hierin verwoordde om de causaliteit tussen ziekteverwekker en ziekte aan te tonen. Deze criteria zijn bekend geworden als de Postulaten van Koch. Kortweg houden ze in dat causaliteit is aangetoond als a) de ziekteverwekker geïsoleerd kan worden uit materiaal van de patiënt, b) de mogelijke verwekker in een reïncultuur<sup>1</sup> gekweekt kan worden en c) toediening van de reïncultuur aan een gevoelig diermodel leidt tot de voor de ziekte kenmerkende ziekteverschijnselen. Het diermodel kreeg hiermee een centrale rol toebedeeld in het microbiologisch onderzoek dat eind 19e eeuw een grote vlucht nam. Besmettelijke kinderziekten als bijvoorbeeld tetanus en difterie waren in die dagen gevreesde aandoeningen met een hoge morbiditeit (mate van voorkomen van de aandoening) en hoge mortaliteit (sterfte percentage). Dankzij proefdieronderzoek kon worden aangetoond wat het besmettelijke agens bij deze ziekten was, en belangrijker nog, het maakte het mogelijk om effectieve behandelingen te ontwikkelen zoals het gebruik van vaccins. Daarbij waren diermodellen onontbeerlijk.

## **De opkomst van vaccins en het gebruik van diermodellen**

De grondlegger voor de wetenschappelijke gefundeerde vaccinontwikkeling is Louis Pasteur (Parish, 1965). Hij ontdekte als eerste, op basis van dierexperimenteel onderzoek, dat inactivatie of verzwakking van een besmettelijk micro-organisme leidt tot een product dat niet meer infectieus is, maar nog wel in staat is om iemand tegen de infectie te beschermen. In maatschappelijk opzicht waren met name de ontwikkelingen op het gebied van difterie en tetanus belangrijk. Er werd ontdekt dat een door micro-organismen geproduceerd toxine aan de deze ziekteverschijnselen ten grondslag lag en dat dit toxine m.b.v. formaldehyde te inactiveren was. Men vond ook

1 Een zuivere kweek van de ziekteverwekker in een verder steriel voedingsmedium.

dat grote hoeveelheden antistoffen kunnen worden opgewekt door paarden met het geïnactiveerde toxine (toxoid) te immuniseren en dat een kind in het begin van een infectie gered kon worden door het met deze paarden-antistoffen in te spuiten. Het succes van deze ontwikkeling was indrukwekkend. Zo werd difterie van een geveesde kindermoordenaar binnen een paar jaar een redelijk gemakkelijk te behandelen aandoening. Sociaal had dit grote gevolgen. Het geloof in het kunnen van de medische wetenschap nam sterk toe en, omdat dierexperimenteel onderzoek zo'n belangrijke rol had gespeeld in de ontwikkeling van het antiserum (tabel 1), nam de maatschappelijke weerstand tegen dit type onderzoek af. Vooral eind 19<sup>e</sup> eeuw was vanuit de maatschappij de kritiek op het dierexperimenteel onderzoek sterk toegenomen, in het bijzonder in Engeland.

*Tabel 1. Gebruikte diersmodellen in de ontwikkeling van difterie therapie en profylaxe (Hendriksen, 1996)*

| Ontwikkeling  | Jaar | Onderzoeker(s)     | Gebruikte diersmodel*                                       |
|---|------|--------------------|---|
| Isolatie van het verantwoordelijk micro-organisme<br>Corynebacterium diphtheria | 1884 | Loeffler           | duif, kip, konijn, cavia                                    |
| Productie van het exotoxine   | 1884 | Roux & Yersin      | Verschillende diersoorten,<br>CAVIA                         |
| Het aantonen van de beschermende werking van het antiserum                      | 1890 | Behring & Kitasato | CAVIA, hond, muis, rat,<br>verschillende andere diersoorten |
| Grootschalige productie van antiserum   | 1894 | Roux & Martin      | hond, schaap, geit, koe,<br>PAARD                           |
| Toxine-antiserum mengsels voor actieve immunisatie                              | 1913 | Behring            | CAVIA   |
| Difterie toxoid (vaccin)  | 1923 | Ramon              | Verschillende diersoorten,<br>CAVIA                         |

\* Het diersmodel dat uiteindelijk het meest geschikt bleek is in hoofdletters aangegeven

Vanaf het einde van de 19<sup>e</sup> eeuw tot op heden heeft dierexperimenteel onderzoek een belangrijke rol gespeeld in de wetenschap die zich met vaccins bezig houdt, de vaccinologie. Allereerst in het ontrafelen van de etiologie (oorzaak van een ziekte), vervolgens in de ontwikkeling van een effectieve therapie of profylaxe en tenslotte in het opzetten van een kwaliteitscontrole van deze producten. Voor wat dit laatste aspect betreft wordt in tabel 2 een overzicht gegeven van de betekenis van het diersmodel voor de controle van het difterieantiserum en het difterievaccin.

Tabel 2. Diermodellen in de kwaliteitscontrole van difterie antiserum en difterie vaccin (Hendriksen, 1996)

| Ontwikkeling   | Jaar | Onderzoeker        | Diermodel   |
|--|------|--------------------|-------------|
| Kwaliteitscontrole difterie antiserum                              | 1892 | Behring & Wernicke | cavia       |
| Introductie van een standaard vaccin in het werkzaamheidsonderzoek | 1897 | Ehrlich            | cavia       |
| Werkzaamheidsonderzoek op basis van een 'parallel-line bioassay'   | 1937 | Prigge             | cavia       |
| Multiple intradermale challenge test                               | 1974 | Knight             | cavia       |
| Werkzaamheidstest op basis van serologie                           | 1985 | Kreeftenberg       | cavia, muis |

### Vaccins en karakteristieken van het proefdiergebruik

In de rapporten "Zodoende" van de Voedsel en Warenautoriteit (VWA, 1978-2004) staat het aantal experimenten gespecificeerd voor de ontwikkeling en controle van immuunsera, vaccins en andere biologische producten. Één experiment is hierbij het onderzoek met één individueel dier. In 2004 ging het om 157.949 experimenten, dit is 25% van het totaal aantal experimenten in dat jaar. Het proefdiergebruik voor de *productie* van vaccins is tegenwoordig praktisch nihil in tegenstelling tot vroeger. Zo werd in het verleden voor de productie van het vaccin tegen polio (kinderverlamming) gebruik gemaakt van apenniercellen. In begin jaren zeventig van de vorige eeuw werden hiervoor aanzienlijke aantallen apen opgeofferd: circa 4000 op jaarbasis. Het gebruik van apen voor dit doel is door diverse maatregelen echter sterk verminderd tot enkele tientallen in de laatste jaren. De recente vervanging van de apenniercel door een cellijn voor de poliovirusproductie zal er toe leiden dat binnenkort het gebruik van apen voor dit doel geheel verleden tijd zal zijn. Wereldwijd zijn er nog maar enkele (virale) vaccintypen die *in vivo* geproduceerd worden. Hoewel voor het hondsdolheidvaccin uitstekende en veilige *in vitro* methoden bestaan wordt in sommige 3e Wereldlanden dit virus nog *in vivo* (baby muizen of konijnen) gekweekt, simpelweg omdat productie op deze manier goedkoper is dan *in vitro*. Verder bestaat voor de productie van het Japanse encephalomyelitis virus nog geen proefdiervrije methode en vindt de productie van het vaccin in hamstercellen plaats.

Van de 157.949 experimenten in 2004 voor vaccindoeleinden in Nederland waren er 52.272 (d.w.z. 33.1%) nodig voor de *ontwikkeling* van nieuwe producten. Daarbij kan gedacht worden aan vaccins tegen hersenvliesontsteking (meningitis veroorzaakt door bijvoorbeeld *Neisseria meningitidis*

of *Haemophilus influenzae*), tegen malaria, HIV en veel ziekten die vanwege bioterrorisme een bedreiging kunnen vormen zoals miltvuur.

In tegenstelling tot het verleden waarin vaccins werden ontwikkeld op basis van inactivatie of verzwakking van de ziektekiem, worden tegenwoordige vaccins met meer kennis van zaken ontwikkeld. Daarbij wordt vaak niet het hele micro-organisme als uitgangspunt genomen, maar alleen die onderdelen (antigenen) van het micro-organismen die essentieel zijn voor het opwekken van een beschermende immunerespons (het ontwikkelen van een weerstand tegen het betreffende micro-organisme). Daarbij gaat het om de isolatie en zuivering aan deze antigenen en het zodanig aanbieden hiervan aan de cellen van het immuunsysteem dat een gerichte en specifieke bescherming ontstaat. Dierexperimenteel onderzoek is onder andere nodig om na te gaan of de geïsoleerde antigenen inderdaad verantwoordelijk zijn voor het opwekken van deze beschermende immuniteit, hoe lang deze immuniteit stand houdt, in welke formulering het antigeen het best kan worden aangeboden en wat de mogelijke bijwerkingen van het antigeen zijn. Omdat antigenen als zodanig vaak niet in staat zijn de immunerespons op een voldoende hoog niveau te brengen wordt gebruik gemaakt van adjuvantia; producten die de immunerespons stimuleren en sturen. Ook aan de selectie van het beste adjuvant ligt vaak dierexperimenteel onderzoek ten grondslag. Tenslotte zijn dierproeven nodig om na te gaan of vaccinantigenen die in combinatie worden toegediend elkaar beïnvloeden.

Verreweg de meeste dieren in het vaccinonderzoek zijn nodig voor de routinecontrole van geproduceerde batches<sup>2</sup> op veiligheid en werkzaamheid. Van de bijna 160.000 experimenten m.b.t. vaccins en andere biologische producten waren er in 2004 ruim 105.000 (67 %) nodig voor dit routineonderzoek. Dit is aanzienlijk meer dan in dat jaar nodig was voor het toxiciteitsonderzoek of het kankeronderzoek. Vaccincontroleonderzoek is in hoge mate wettelijk vastgelegd. Zo werden in 2004 ruim 52.000 (33.1%) van deze experimenten uitgevoerd vanwege wettelijke bepalingen. Veelal zijn dit de voorschriften van de Europese Farmacopee (routinecontrole) of van de European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA) voor de registratie van nieuw producten. Een laatste kenmerk van het vaccinonderzoek is het verhoudingsgewijs hoge aantal experimenten met meer dan matig ongerief (18% bij vaccinonderzoek tegen 12.8% voor het totaal dierexperimenteel onderzoek).

2 Een 'batch' is een partij vaccin die tegelijkertijd en met dezelfde grondstoffen wordt gemaakt.

### De 3 V's in het vaccinonderzoek

Bij een immunisatie worden in het lichaam complexe mechanismen in werking gezet. Het vaccinantigeen wordt allereerst opgenomen en verwerkt door afweercellen (macrofagen en dendritische cellen). Het verwerkte antigeen wordt vervolgens aangeboden aan specifieke cellen van het immuunsysteem (T- en B-cellen) waarbij de onderlinge afstemming van deze cellen mede geregeld wordt door specifieke stoffen zoals cytokinen. Vervolgens komt een immuunrespons op gang die specifiek gericht is op het betreffende antigeen en waarvan de informatie wordt vastgelegd in memory cellen.

Voorlopig ziet het er niet naar uit dat dit complexe proces door *in vitro* systemen kan worden gekopieerd. Dat neemt niet weg dat er inmiddels veel bereikt is op het gebied van alle drie de Vs. De vooruitgang is vooral geboekt op het terrein van de wettelijk vastgelegde kwaliteitscontrole. Het gaat hierbij om onderzoek met een repeterend karakter en duidelijk omschreven wetenschappelijke eindpunten zoals het ontstaan van specifieke klinische verschijnselen in het kader van het veiligheidsonderzoek (bijvoorbeeld het ontstaan van difterie als gevolg van het onvoldoende detoxificeren van het difterie toxine) of het opwekken van een beschermende antistofrespons na vaccinatie (bijvoorbeeld in geval van het tetanusvaccin). De ontwikkelde alternatieven zijn zeer divers en variëren van de introductie van humane eindpunten (het punt waarop dieren vanwege het ongerief uit de proef worden genomen), de retrospectieve analyse van gegevens uit het verleden tot het gebruik van *in vitro* methoden als celculturen, immunochemische technieken als Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)<sup>3</sup> of fysisch-chemische methoden. Een overzicht van beschikbare 3 V methoden wordt gegeven in de bijlage. Veel van de methoden zijn inmiddels geaccepteerd door de Europese Farmacopee, vaak op basis van uitgevoerd validatieonderzoek. Niet altijd betekent dit dat de methode ook in de praktijk wordt gebruikt. Harmonisatie in de regelgeving tussen de verschillende continenten is soms ver te zoeken. In Europa worden de voorschriften van de Europese Farmacopee gehanteerd, maar in de VS wordt nog uitgegaan van de diertest zoals voorgeschreven door de Food and Drug Administration (FDA) en de United States Department of Agriculture (USDA). Dit houdt in dat het product alsnog volgens die voorschriften moeten worden gecontroleerd. Aan de harmonisatie van regelgeving of wederzijdse erkenning van testvoorschriften

3 Hierbij wordt het te meten antigeen aan een gelabelde antistof verbonden. Via het label kan men vervolgens het eiwit meten, bijvoorbeeld via een kleurreactie.

wordt gewerkt door de International Conference on Harmonization (ICH), een internationale organisatie voortkomend uit een samenwerkingsverband tussen de farmaceutische industrie en de regelgevende autoriteiten uit drie machtsblokken: de VS, Japan en Europa. Helaas is een en ander een moeizaam proces en de vooruitgang in de 3 V's is beperkt. In de volgende paragraaf zullen enkele 3 V methoden verder worden uitgewerkt.

### **Voorbeelden van 3 V-alternatieven in het vaccinonderzoek**

Het hoge percentage aan experimenten in de categorie vaccinonderzoek dat met meer dan matig ongerief gepaard gaat wordt vooral veroorzaakt door het werkzaamheidsonderzoek op geïnactiveerde vaccins. Voor deze testen zijn veelal grote aantallen dieren per test nodig. Daarbij leidt de challenge of blootstellingsprocedure, die deel uitmaakt van de test, bij een deel van de dieren tot sterfte of ernstig klinische verschijnselen. Het principe van de test is als volgt: groepen proefdieren worden geïmmuniseerd met verdunningen van het te onderzoeken vaccin. Na een immunisatieperiode die afhankelijk is van het type vaccin worden de dieren ingespoten met een letale dosis van het desbetreffende virulente micro-organisme waarna sterfte of ernstige klinische verschijnselen binnen een vastgestelde periode als wetenschappelijk eindpunt worden gebruikt om de werkzaamheid van het vaccin te bepalen. Deze protocollen liggen vast in de regelgeving en wijziging betekent dat in een validatiestudie de betrouwbaarheid en relevantie van de nieuwe of alternatieve methoden moet worden aangetoond.

Dit proces om de regelgevende autoriteiten te overtuigen van de kwaliteit van een nieuwe methode is meestal tijdrovend. Het tijdsinterval tussen start van de ontwikkeling van de 3 V methode en acceptatie ervan door de autoriteiten kan al snel meer dan 15 jaar vergen (zie ook de bijdrage van Coecke et al.). Zoals uit tabel 3 (in de bijlage) kan worden opgemaakt is dit toch voor een aantal testen al gelukt. Redelijk eenvoudig was de vervanging van sterfte door humane eindpunten als eindpunt in het werkzaamheidsonderzoek. Voor verschillende vaccintypen als kinkhoest, hondsdolheid, tetanus en vlekziekte is aangetoond dat bepaalde klinische verschijnselen voorspellend kunnen zijn voor sterfte binnen de observatieperiode. Dieren worden dan geëuthanaseerd omdat de beoogde kennis is verkregen. Toch kunnen deze alternatieve eindpunten niet gegeneraliseerd worden voor alle vaccins. Ze zijn gerelateerd aan het vaccintype. Zo is gewichtsverlies een bruikbaar humaan eindpunt in het hondsdolheidwerkzaamheidsonderzoek maar niet in het kinkhoestwerkzaamheidsonderzoek. En, terwijl een zeke-

re daling in lichaamstemperatuur bruikbaar is voor het kinkhoestvaccin is dit niet het geval voor het hondsdolheidvaccin. Daarentegen zijn er per vaccintype wel specifieke klinische verschijnselen te benoemen die voor bijna 100% voorspellend zijn voor sterfte binnen de observatieperiode, zoals 'circling' bij het hondsdolheidwerkzaamheidsonderzoek (Cussler et.al., 1999). Gebruik van deze eindpunten maakt het mogelijk om dieren die ernstig lijden een halve dag tot 3 dagen eerder uit het experiment te halen. Inmiddels is in de Europese Farmacopee het gebruik van humane eindpunten vastgelegd, onder de voorwaarde dat deze zijn gevalideerd.

Een verdere verfijning van het werkzaamheidsonderzoek van bepaalde vaccins heeft kunnen plaatsvinden door de hierboven beschreven challenge procedure te vervangen door een serologische test: bloedafname van de dieren en titratie (concentratiebepaling) van het serum op beschermende antistoffen. Dit lukt alleen voor die vaccins waarvan men weet dat bescherming gebaseerd is op de werking van antistoffen. In sommige gevallen echter is bescherming niet alleen gebaseerd op antistoffen maar ook op de activiteit van bepaalde witte bloedcellen. In die gevallen waarin ook de cellulaire bescherming een rol speelt werkt de methode niet. Na uitvoerige internationale validatiestudies zijn recent de serologische testen voor het tetanus- en difterie-vaccin geaccepteerd door de Europese Farmacopee. Serologische testen hebben verschillende voordelen (Hendriksen, 2005). Allereerst vermindert de invoering van een serologische test op een effectieve manier het ongerief. Het ongerief in een challengetest wordt ingeschaald als ernstig, in een serologische test als gering/matig. Daarnaast wordt de kwalitatieve parameter sterfte/overleving vervangen door een individuele kwantitatieve maat (antistoftiter). Dit maakt dat er per dier meer informatie verkregen wordt en het mogelijk wordt het aantal dieren te beperken. In plaats van 16 dieren per verdunning die in het verleden werd gebruikt kan de test nu worden uitgevoerd met 8 dieren per verdunning. Tenslotte maakt de toepassing van serologie het mogelijk om werkzaamheidstesten voor meerdere producten te combineren, bijvoorbeeld het difterie- met het tetanuswerkzaamheidsonderzoek. Zo kan een verdere reductie in aantallen dieren worden bereikt.

### **Toekomstige ontwikkelingen**

Het voorgaande laat zien dat er binnen de vaccincontrole veel op het gebied van de 3 V's kan worden bereikt. De ontwikkelingen gaan door. Met enige voorzichtigheid mag verwacht worden dat in een volgende generatie nog maar een fractie van het aantal dieren dat nu gebruikt wordt, nodig zal zijn



voor vaccincontrole doeleinden. Momenteel wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van *in vitro* parameters voor het monitoren van de kwaliteit van een nieuw geproduceerde batch vaccin. Het gaat daarbij om biochemische en immunochemische methoden die informatie geven over de kwaliteit van het antigeen. Daarnaast worden er ook *in vitro* testen ontwikkeld die inzicht verschaffen over cruciale stappen in de immuunrespons van een organisme zoals de antigeenopname en -verwerking of de interactie tussen T cellen en B cellen van het immuunsysteem. Wat al deze testen niet kunnen is een exacte bepaling geven van de werkzaamheid van een vaccin, iets wat de traditionele diertest wel kan. Echter, de *in vitro* testen kunnen wel laten zien of een nieuw geproduceerde vaccinbatch in kwaliteit niet onderdoet voor een vaccinbatch waarvan in de praktijk is aangetoond dat het werkt. Dit principe wordt ook wel aangeduid als de ‘consistency’ benadering (Metz et al., 2002). Geen ‘V’ in de strikte betekenis van Russell & Burch (1959), maar waarschijnlijk veel effectiever dan de alternatieven die gericht zijn op een 1 op 1 vervanging van de diertest door een proefdiervervangende methode. De toekomst zal waarschijnlijk leren dat de echte 3 V winst vooral te behalen is uit een andere strategie van onderzoek doen en minder uit het vervangen van een bestaand diermodel door een 3 V model.

## Literatuur

- Cussler K., Morton D.B. & Hendriksen C.F.M. (1999). Humane endpoints in vaccine research and quality control. In: Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. Hendriksen C.F.M. & Morton D.B. (eds). The Royal Society Medicine Press, London (UK). pp. 95-101.
- Halder M. (2001). Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals. ALTEX., 18 Suppl 1: 13-47.
- Hendriksen C.F.M. (1996). A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. In: Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products. Brown F, Cussler K & Hendriksen C (eds.). Dev. Biol.Stand. Karger, Basel., 86: 3 – 10.
- Hendriksen C.F.M. (2005). Animal models in vaccinology. In: Handbook of Laboratory Animal Science Volume II: Animal Models, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, editors Jann Hau and Gerald Van Hoosier : p.1-14.
- Parish H.J. (1965). A History of Immunization. E & S Livingstone, London.
- Metz B., Hendriksen C.F., Jiskoot W., Kersten G.F. (2002). Reduction of animal use in human vaccine quality control. Vaccine. 20 : 2411-30
- Russell W.M.S. & Burch, R.L. (1959) The Principles of Humane Experimental Technique, Potters Bar, Herts., UK: UFAW .
- Zo doende (1978 – 2004) Jaaroverzicht van de Voedsel en Waren Autoriteit over dierproeven en proefdieren (VWA). Den Haag: VWA.

*Bijlage: Overzicht van 3 V-methoden in de kwaliteitscontrole van vaccins (Holder, 2001)*

| Vraagstelling   | Klassieke diertest   | Alternatief   | Soort alternatief            | Practische implementatie |
|---|--|---|------------------------------|--------------------------|
| Onderzoek op pyrogeniteit   | Konijnen   | LAL test en in vitro monocyten test   | vervanging                   | ja                       |
| Productie geïnactiveerd kindervermingsvaccin  | Gebruik apen voor de levering van niercellen   | Kweek virus in cellijn (sommige landen houden vast aan apenriercellen)                | vervanging                   | ja                       |
| Onderzoek op abnormale toxiciteit in muis en cavia's (alle vaccins)                                 | Muis en cavia  | Test is voor routine toepassingen geschikt uit EP-voorschriften                       | 'vervanging'                 | ja                       |
| Onderzoek op specifieke toxiciteit voor het Difterievaccin  | cavia  | Gebruik van Vero cellen   | vervanging                   | ja                       |
| Onderzoek op werkzaamheid van het tetanus en difterievaccin   | Kwantitatieve challenge test (letaal of klinische verschijnselen) in muis of cavia         | Challenge vervangen door serologie (ToBI/ELISA) en Vero cellen + combinatie onderzoek | vermindering en verfijning   | ja                       |
| Onderzoek op werkzaamheid van het tetanus en difterievaccin   | Kwantitatieve challenge test (letaal of klinische verschijnselen) in muis of cavia         | Multi-dose test vervangen door single-dose test in cavia's                            | Vermindering                 | binnenkort               |
| Onderzoek op werkzaamheid van het geïnactiveerd poliovaccin (serologische test in rat/cavia of klp) | Serologische test in de rat  | Test vervangen door in vitro test (D-antigeen test)                                   | vervanging                   | nee                      |
| Onderzoek op werkzaamheid vleezigte vaccin  | Kwantitatieve challenge test (letaal of klinische verschijnselen) in muis                  | Test vervangen door serologie (ELISA):  | Vermindering en verfijning   | ja                       |
| Onderzoek op veiligheid geïnactiveerd vleezigte vaccin  | Onderzoek in varkens   | Test is geschikt  | 'vervanging'                 | ja                       |
| Onderzoek op werkzaamheid Leptospirose vaccin   | Letale challenge test in hamsters  | In vitro (ELISA) methode  | vervanging                   | nee                      |
| Onderzoek op werkzaamheid vechtrijne Clostridium vaccins  | Kwantitatieve challenge test (letaal of klinische verschijnselen) in muis, cavia of konijn | In vitro (ELISA, celkweek) methoden   | Vermindering en verfijning   | deels                    |
| Onderzoek op werkzaamheid hondsdolheidsvaccin   | Kwantitatieve challenge test (letaal) in muizen  | In vitro antigeniciteitstest met (monoclonale antistoffen)                            | vervanging                   | nee                      |
| Onderzoek op neurovirulentie oraal poliovaccin  | Onderzoek in primaten  | PCR methode (MAPREC) en gebruik transgene muis  | Vervanging, resp. verfijning | deels                    |
| Onderzoek op werkzaamheid tetanus immunoglobuline   | Toxine neutralisatie test in de muis   | In vitro immunochemische methoden   | vervanging                   | ja                       |
| Diertesten met sterfte of ernstig klinische verschijnselen als eindpunt                             | Letale of ernstig klinische eindpunten   | Toepassing van humane eindpunten  | verfijning                   | ja                       |

# Genomics en alternatieven voor dierproeven

*Marjolein M.F. van Boxel*

Innovatie in wetenschappelijke technologie is essentieel voor de ontwikkeling van nieuwe alternatieve methoden in het biomedisch onderzoek. De meest succesvolle alternatieve methoden zijn niet alleen te prefereren uit het oogpunt van dierenwelzijn, maar vooral ook omdat zij wetenschappelijk meer geavanceerd zijn, betrouwbare resultaten opleveren en vaak zelfs goedkoper en sneller zijn.

Sinds de ontdekking van het DNA heeft de moderne biotechnologie een enorme ontwikkeling doorgemaakt. Zo werd tijdens het Human Genome Project (HUGO) in onverwacht hoog tempo het complete genoom (het totale genenpakket) van de mens, dat 20.000 tot 30.000 genen en ongeveer 2.900 miljoen genbasen omvat, in kaart gebracht. Inmiddels is ook het genoom van een groot aantal plant- en diersoorten bekend. Onderzoek dat van deze informatie gebruik maakt, wordt genomics genoemd. Dit type onderzoek moet als een compleet nieuwe onderzoeksbenadering worden beschouwd waarin momenteel grote vooruitgang wordt geboekt. De term 'genomics' omvat een breed onderzoeksgebied dat zich bezighoudt met het identificeren, karakteriseren en de werking van de genen en genproducten (zoals eiwitten en stofwisselingsproducten) van levende organismen. Hierbij wordt gebruikgemaakt van specifieke *in vitro* technieken, zoals DNA micro-array en gel-electroforese.

In juni 2004 werd door het RegieOrgaan Genomics in samenwerking met het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven het congres 'Genomics & Alternatives to Animal Use' georganiseerd.<sup>1</sup> Tijdens dit congres werd door stakeholders gediscussieerd over de mogelijkheden van toepassing van genomics voor de vervanging, vermindering en verfijning van het proefdiergebruik. De nu volgende tekst is gebaseerd op zowel de uit-

1 Zie ook Thole, E. (2005) Synopsis 'Genomics & alternatives to animal use'. Highlights of the international conference that was held on 2 - 4 June 2004, in Maastricht. [http://www.genomics.nl/Home/Publications/Conference%20Publications/Synopsis%20\\_Genomics%20\\_%20alternati.aspx](http://www.genomics.nl/Home/Publications/Conference%20Publications/Synopsis%20_Genomics%20_%20alternati.aspx)

komsten van dit congres als de gesprekken die ter voorbereiding van het congres met diverse stakeholders werden gevoerd.

### **Genomics: vernieuwend in dierexperimenteel onderzoek**

In het traditionele dierexperimentele onderzoek is het proefdier feitelijk een 'black box'. Het dier wordt onderworpen aan een behandeling, die resulteert in een aantoonbaar effect. De achterliggende mechanismen die dat effect tot uiting brengen zijn echter niet zo duidelijk. Van de zich steeds verder ontwikkelende genomics- en genicotechnologieën wordt verwacht dat ze uiteindelijk een groter inzicht zullen verschaffen in de biologische processen die leiden tot veranderingen in gedrag en fysiologische verschijnselen. Toepassing van snel werkende en veel data genererende zogenaamde 'high-throughput' technologieën, waarbij bijvoorbeeld gebruik wordt gemaakt van micro-arrays voor een enorm aantal genen, maken het immers voor het eerst mogelijk om in elk (pathologisch) stadium middels één enkel experiment de expressie van een groot aantal genen of genproducten zichtbaar te maken. De ontwikkeling van deze technologieën is al redelijk ver gevorderd. De verwerking en analyse van de verzamelde gegevens vormt voornamelijk een grote uitdaging. Indien patronen van niet-geactiveerde (down-reguleerde) en geactiveerde genen gekoppeld zouden kunnen worden aan specifieke, al dan niet met ziekten verbonden fysiologische verschijnselen, zouden genen kunnen worden aangewezen die betrokken zijn bij bepaalde biologische processen. Genomicstechnologieën zouden zo kunnen worden toegepast om nieuwe en vaak al bestaande biomarkers<sup>2</sup> te definiëren in conventionele onderzoeksmodellen, die gebaseerd zijn op weefselkweken of diermodellen.

### **De verschillende '-omics' technologieën**

Binnen het brede veld van genomics kan een onderverdeling worden aangebracht op basis van het onderzoeksdoel, zoals het in kaart brengen van DNA sequenties (*structural genomics*), het onderzoeken van de relatie tussen genoom-activiteit en biologische processen (*functional genomics*) of het vergelijken van het genoom en de genexpressie van verschillende organismen om inzicht te verkrijgen in de soortspecifieke genoomstructuur (*comparative genomics*). Maar er kan ook een verdeling worden gemaakt op basis van de gebruikte wetenschappelijke technieken: transcriptomics, proteomics,

2 Biologische parameters die een signaalfunctie hebben voor de toestand van het organisme.

metabolomics en bio-informatica. Deze laatste onderverdeling suggereert een duidelijke scheiding, maar feitelijk vullen deze technieken elkaar aan:

- Transcriptomics heeft als doel door het vergelijken van genexpressieprofielen te bepalen welke genen in verschillende (patho)fysiologische stadia worden geactiveerd, om van daaruit inzicht te krijgen in de reacties van de cel. Transcriptomics is daarom toepasbaar in een breed scala van wetenschappelijk onderzoek.
- Proteomics is gericht op het definiëren en bestuderen van alle proteïnen (eiwitten) in een organisme, orgaan of organel. Daarnaast wordt de variatie van de eigenschappen van deze proteïnen in locatie, tijd en fysiologische toestand onderzocht. Met behulp van proteomics kan het inzicht in de moleculaire basis van biologische processen dus verder worden vergroot en wordt weer compleet andere informatie verkregen dan met transcriptomics.
- Bij metabolomics worden met behulp van genomicstechnieken de metabole processen (stofwisseling) in kaart gebracht. Zo kunnen door een systematische vergelijkende analyse van urine-, speeksel- of bloedplasmamonsters bepaalde verstoringen op gen- en eiwitniveau worden gelineerd aan metabolische afwijkingen. Omdat de metabolische staat van een biologisch systeem grotendeels wordt bepaald door de globale genom- en proteoomexpressies, is een integratie van transcriptomics- en proteomicsgegevens essentieel. Overigens zijn de technieken die worden toegepast in metabolomicsonderzoek doorgaans minder complex en minder kostbaar dan de technieken die worden gebruikt in het transcriptomics- en proteomicsonderzoek.
- De bio-informatica ontwikkelt de methoden waarmee subtiele relaties tussen genactiviteit, mRNA, eiwitten, metabolieten en (patho)fysiologische processen kunnen worden ontdekt. Voor een optimaal gebruik van alle met deze genomicstechnologieën gegenereerde gegevens is de bio-informatica van doorslaggevend belang. Het zijn de door de bio-informatica ontwikkelde innovatieve berekeningsmethoden en databases die de razendsnelle analyse en interpretatie van de enorme hoeveelheden genomicsgegevens mogelijk moeten maken. Juist hierin schuilt het mogelijke toekomstige belang van deze genomicstechnologieën voor het biomedisch onderzoek.

## **Genomics en mogelijkheden voor Vervanging, Vermindering en Verfijning van het dierproefgebruik**

Aangezien het genomics onderzoeksgebied nog sterk in ontwikkeling is, is de aard en omvang van het effect op het proefdiergebruik op de langere termijn nog moeilijk te voorspellen. Het door toepassing van genomics technologieën vergrote inzicht in biologische processen zou op zijn beurt immers kunnen resulteren in nieuwe vraagstellingen, die door aanvullend, veelal dierexperimenteel onderzoek, zullen moeten worden getoetst. Zo zal voor het verder onderzoeken van mogelijk interessante genen een groot aantal knock-out dieren geproduceerd moeten worden. Daarom wordt verwacht dat toepassing van genomics technologieën in eerste instantie zal leiden tot een sterke toename in het proefdiergebruik. Tegelijk zijn er echter mogelijkheden om genomics aan te wenden voor de door Russell & Burch in 1959 gedefinieerde 3 V's van Vervanging, Vermindering en Verfijning van proefdiergebruik.

De grootste mogelijkheden zullen daarbij voorlopig liggen op het gebied van de verfijning en vermindering van dierexperimenteel onderzoek. Door toepassing van eerdere (humane) eindpunten kunnen de pijn en het ongemak waaraan de proefdieren worden blootgesteld sterk worden teruggebracht. De gebruikte proefdieren kunnen bijvoorbeeld door een vroege signalering met behulp van genomics technieken vroegtijdig uit de proef worden gehaald. Genexpressieprofielen kunnen namelijk al zeer vroeg in het pathofysiologische proces worden bestudeerd, zelfs voordat pathologische symptomen zichtbaar worden. Bovendien zouden meer en wetenschappelijk meer relevante gegevens kunnen worden verkregen uit een kleiner aantal proefdieren. Toepassing van metabolomicstechnologieën zal het daarnaast mogelijk maken om minder invasieve procedures te gebruiken, zoals door het testen van urine in plaats van bloed. Ten slotte kan een interdisciplinaire uitwisseling van genomics data via publiek toegankelijke databases (*data sharing*) resulteren in een efficiënter diergebruik en uiteindelijk mogelijk in een vermindering van het aantal gebruikte proefdieren. Er zijn echter nog grote inspanningen noodzakelijk om al deze verwachtingen uiteindelijk waar te kunnen maken. Met name de stap van het interpreteren van de enorme hoeveelheid verzamelde genomics gegevens en het ontrafelen van de biologische mechanismen vormen een uitdaging van haast niet te overziene proporties. Deze stap is echter essentieel voor het uiteindelijke belang van genomics in het kader van de 3 V's.

Als illustratie van de mogelijkheden voor de 3 V's wordt hieronder een aantal voorbeelden geschetst:

- Wanneer ontwikkelingen in de genomics resulteren in een toegenomen begrip van de effecten van bepaalde genactivatiepatronen, zal dit in de toxicologie leiden tot de ontwikkeling van voorspellende tests (*predictive screens*). Deze geautomatiseerde screeningmethoden kunnen bijvoorbeeld dienen als een eerste scan van nieuwe, mogelijk interessante chemische stoffen. Het testen op dieren wordt zo uitgesteld tot een later stadium, waardoor een besparing in het aantal gebruikte proefdieren per te testen stof kan worden bereikt (zie ook de bijdrage van Schoonen & Horbach in deze bundel). Daarnaast wordt verwacht dat met genomics al bij zeer lage doseringen zeer kleine veranderingen in de genexpressie zichtbaar kunnen worden gemaakt zonder dat er zich pathologische verschijnselen voordoen. Wanneer deze verwachting bewaarheid wordt, zouden bij sommige toxicologische onderzoeken lagere, subklinische doseringen van de te bestuderen chemische stof of medicijn kunnen worden toegepast. Door het uitblijven van pathologische reacties is het misschien mogelijk in sommige gevallen deze stoffen op menselijke vrijwilligers te testen.
- ‘Predictive screens’ kunnen ook in de medicijnontwikkeling worden toegepast. In dit onderzoeksveld bestaat al geruime tijd grote belangstelling voor de mogelijkheden van genomics om de beperkingen van de huidige testsystemen (zoals de lange ontwikkelingstijden en het gebrek aan mechanistisch inzicht) te omzeilen. Door het toegenomen inzicht in de achterliggende biologische mechanismen zou de voorspellende waarde van tests kunnen worden vergroot. Niet-invasieve genomics onderzoeksmethoden zouden het bovendien mogelijk kunnen maken studies aan het doelorganisme van het te ontwikkelen medicijn uit te voeren. Een belangrijke doelstelling van het genetisch onderzoek is bovendien de ontwikkeling van medicijnen-op-maat, die via een zogenaamde ‘individuele profilering’ worden afgestemd op de genetische kenmerken van de patiënt. Het effect van de op de individuele patiënt afgestemde dosis werkzame stof zou in hoge mate kunnen worden voorspeld en de kans op bijwerkingen zou sterk worden verminderd.
- De voltooiing van complete genomosequenties van de mens en andere organismen brengt daarnaast een totale ommezwaai teweeg in de voorspelling, prognose en diagnose van ziekten. De mogelijke toepassing van genomics in deze studies is echter afhankelijk van de te bestuderen ziekte. Door de complexiteit van ziekteprocessen is het echter onwaarschijnlijk dat op genomics gebaseerde *in vitro* modellen in de nabije toekomst zul-

len leiden tot een totale vervanging van diermodellen. In het fundamentele ziekteonderzoek zou het accent meer en meer kunnen komen te liggen op het gebruik van *in vitro* modellen met celculturen of modellen van humane weefsels uit bestaande weefseldatabanken (zie ook de bijdrage van Groothuis en Van der Valk in deze bundel). De wijze van opslaan is vanzelfsprekend van doorslaggevend belang voor de uiteindelijke bruikbaarheid van de weefselmonsters voor genomische toepassingen. Uit veel monsters in bestaande databanken blijkt het niet goed mogelijk goed RNA te isoleren.

- Genomische technologieën kunnen ook van groot belang zijn voor het verfijningsonderzoek, dat enerzijds gericht is op het vergroten van het inzicht in pijn en ongerief en anderzijds op het ontwikkelen van methoden waarbij met zo min mogelijk pijn en ongerief zoveel mogelijk wetenschappelijk hoogstaande resultaten kunnen worden verkregen. Toepassing van door genomics gegenereerde informatie kan leiden tot verminderde stress bij de te gebruiken proefdieren, wat uiteindelijk zowel het dierenwelzijn als de wetenschappelijke kwaliteit van de onderzoeksresultaten ten goede zou komen. De ontwikkeling van biomarkers voor welzijn, gezondheid, stress, ongerief en lijden bij mens en dier zou een brede toepassing kunnen vinden.
- Een belangrijke focus voor de ontwikkeling van alternatieven ligt echter bij het regelgevend onderzoek. Implementatie van op genomische technologie gebaseerde alternatieven zou in dit onderzoeksveld in termen van de 3 V's een grote internationale impact kunnen hebben. Bestaande testregimes zouden met behulp van deze innovatieve methoden opnieuw geëvalueerd kunnen worden, wat zou kunnen resulteren in meer flexibele testprocedures. Bovendien kan toepassing van de per studie, door genomics onderzoek bepaalde optimale cel-, weefsel- of orgaankweek de huidige *in vitro* modellen verbeteren en meer relevant maken voor extrapolatie naar de situatie *in vivo*. Door de meer op wetenschap gebaseerde keuze voor het optimale onderzoeksmodel zou bij het testen van bekende targets bovendien de noodzaak voor het testen op een tweede diersoort kunnen afnemen. In veel gevallen zou immers direct op (cellen van) het doelorganisme van de te testen stof getest kunnen worden.

### **Validatie van op genomics gebaseerde alternatieven**

De met behulp van genomics verkregen biomarkers zullen voor toepassing in onderzoek ten behoeve van regelgeving een validatieproces moeten door-



lopen, waarbij de betrouwbaarheid en herhaalbaarheid wordt vergeleken met die van de zogenaamde 'gouden standaard': de met dierproeven verkregen standaarden. De validatieprincipes en -criteria die zijn neergelegd in richtlijnen van de Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) en het European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) gelden ook voor onderzoek dat is gebaseerd op genomics. De complexiteit van genomicsstechnologieën en de hoge kosten die ermee gepaard gaan kunnen validatiestudies echter sterk beperken. Bovendien wijken veel bestaande onderzoeksbenaderingen af van genomicsmethoden omdat de laatste zich vooral richten op basale cellulaire processen. De noodzaak om de relevantie van genomicsmethoden vast te stellen aan de hand van een in beginsel imperfecte (want gebaseerd op relatief beperkte kennis van de betrokken biologische mechanismen) 'gouden standaard' is daarom problematisch. De nieuwe technologieën kunnen dus een specifieke validatiestrategie vereisen, waarbij het zwaartepunt juist ligt op de aantoonbare mechanistische basis. De beschikbaarheid van centrale, publiek toegankelijke databanken en het gebruik van gegevens uit gestandaardiseerde studies met referentiematerialen, -stoffen en -behandelingen en goed gedocumenteerde (patho)fysiologische effecten zullen hierbij van essentieel belang blijken te zijn.

### **Obstakels voor toepassing van genomics**

Van genomicsstechnologieën wordt verwacht dat ze grote mogelijkheden zullen hebben voor onderzoek aan mens en dier. Toch bestaat er enige bezorgdheid over de aannames waarop resultaten van genomicsonderzoek worden gebaseerd. Zo kunnen verschijnselen op hogere niveaus worden gemist door de reductie van biologische processen tot het genniveau. Er kunnen problemen optreden in de extrapolatie van celkweken naar het organisme als geheel, in de relatie tussen genexpressie en acute of chronische effecten en in de relatie tussen dosis, expressieprofiel en fysiologische verschijnselen. Bovendien vinden allerlei interacties tussen het genoom en het proteoom en tussen genen onderling plaats die het moeilijk maken om causale relaties tussen genen en fysiologische verschijnselen te leggen. Hoewel inmiddels de basenvolgorde van het genoom van een groot aantal diersoorten bekend is, zal er nog een aanzienlijke inspanning nodig zijn om de functionele rol van deze genen te weten te komen. Daarnaast vergt de interactie te vinden tussen de genen en de proteïnen waarvoor ze coderen en

biologische correlaties tussen verschillende soorten organismen nog veel onderzoeksinspanning. In de meeste gevallen is er nog onvoldoende informatie voorhanden over zowel de relatie tussen een eindpunt in genomics-onderzoek aan dieren en het (biologische) fenomeen dat wordt bestudeerd, als over de reproduceerbaarheid van de testmethode binnen en tussen laboratoria. Het gebruik van apparatuur en materialen van verschillende make-lij blijkt bijvoorbeeld verschillende resultaten op te leveren. De gevoeligheid van de genomicstechnologie bemoeilijkt dus de standaardisatie.

### **Een gezamenlijke toekomst voor genomics en de 3 V's**

Het aantal uitgevoerde experimenten en het aantal gebruikte dieren in een experiment is afhankelijk van het onderzoeksgebied en de onderzoeksvraag, maar ook van de missie van het onderzoeksinstituut en de houding van de betrokken wetenschappers. Op dit moment wordt zo'n 1% van het totale aantal proefdieren, overwegend knaagdieren (muis en rat) en vissen, gebruikt in genomicsonderzoek. De mate van pijn en ongerief waaraan deze dieren worden blootgesteld is normaliter niet zozeer gerelateerd aan de toepassing van genomicstechnieken, maar eerder aan het primaire onderzoeksdoel. Het nog relatief lage percentage gebruikte dieren komt deels voort uit de hoge kosten die gepaard gaan met genomicsonderzoek en de enorme hoeveelheid gegenereerde data die per dier dient te worden geanalyseerd. Andere belangrijke karakteristieken van genomics zijn de globalisering van het onderzoek als gevolg van de vereiste grote financiële investeringen, het belang van informatietechnologie en de noodzaak van interdisciplinaire uitwisseling van informatie. Vooropgesteld dat er een bereidheid zou zijn tot het uitwisselen van onderzoeksresultaten, zou een gebruiksvriendelijk en krachtig databasesysteem zinvol zijn om hiermee om te kunnen gaan. Echter, de complexiteit van de opzet van dit soort onderzoek, de nieuwe ontwikkelingen in de gebruikte technologieën en de variabiliteit tussen laboratoria onderling leiden vaak tot een zekere variatie in de data. Verdere standaardisatie is daarom noodzakelijk. Een succesvolle interpretatie van genprofielstudies is dus afhankelijk van de integratie van experimentele data met externe informatiebronnen, maar ook van het vermogen de bioinformatica te integreren in het onderzoeksproces. Er zullen ook meer effectieve modellen voor de interpretatie van data en statistische analyse moeten worden ontwikkeld. Daarnaast vormen financiële bronnen vanzelfsprekend een belangrijke factor voor succesvolle implementatie van op genomics gebaseerde alternatieven. Maar ook het maatschappelijke belang van het

onderzoek, de vooruitzichten voor de mogelijkheden om de onderzoeksvragen met behulp van de nieuwe technologieën te beantwoorden en de economische impact van de technologie voor de industrie zijn van invloed. Het is daarom van groot belang ervoor te zorgen dat door een grondige herziening van bestaande testgegevens, wederzijdse erkenning (*mutual recognition*) van regelgevende besluiten en een actieve uitwisseling van gegevens de eventuele aanvullende diertesten worden geminimaliseerd. Harmonisatie via organisaties zoals de World Health Organization (WHO), International Standards Organization (ISO), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) en Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) zal ook voor de nieuwe gevalideerde en geaccepteerde methoden de prioriteit moeten krijgen. Internationaal geharmoniseerde regelgeving zou immers moeten leiden tot toegenomen efficiëntie bij farmaceutische bedrijven, omdat zij niet langer zouden hoeven te beantwoorden aan afwijkende wettelijke eisen van verschillende landen. Door internationale harmonisatie van wettelijke standaarden kan dubbel werk worden vermeden en wordt de werklast gedeeld (zie ook de bijdrage van Honig in deze bundel).

### **Aanbevelingen**

Soms al wordt parallel aan de gebruikelijke testmethoden ook de nieuwe, op genomics gebaseerde testmethoden toegepast zonder dat daarbij het proefdiergebruik wordt verhoogd. Hierdoor wordt de bekendheid met en het vertrouwen in de nieuwe genomics-technologieën sterk vergroot. Overeenkomstig het Human Genome Project kunnen ook nu bepaalde gecoördineerde inspanningen zeer waardevol blijken. Verder zijn geavanceerde methoden van informatietechnologie en bio-informatica essentieel voor het bereiken van een effectieve integratie van transcriptomics-, proteomics- en metabolomicsgegevens. Een proces van standaardisatie, validatie en wetenschappelijke en regelgevende acceptatie is vervolgens noodzakelijk om routinematige toepassing van deze genomics technologieën mogelijk te maken.

Bovendien zal er gericht aandacht moeten worden besteed aan het rapporteren over specifieke 'case studies' waarbij toepassing van genomics heeft geleid tot ontwikkeling en toepassing van een 3 V methode. Het feit dat deze 3 V methoden vaak niet alleen maar 'een alternatief' maar juist meer geavanceerd zijn in termen van het vergroten van zowel de wetenschappelijke inzichten als in de mate van bescherming van de volksgezondheid, kan

immers doorslaggevend blijken in het overtuigen van niet alleen de wetenschappers die zich bezighouden met dierexperimenteel onderzoek, maar ook van de regelgevers en het grote publiek.

# De computer als alternatief?

Lars Ridder

Zoals dierproeven en laboratoriumexperimenten met nieuwe stoffen als “*in vivo*” en “*in vitro*” experimenten worden aangeduid, zo worden computermodellen voor het berekenen en voorspellen van stofeigenschappen ook wel als “*in silico*” methoden gekenschetst (duidend op een belangrijk bestanddeel van computerchips: silicium). Het gaat hierbij om berekeningen en voorspellingen die gebaseerd zijn op de chemische structuur van de te bestuderen stof en vaak ook op de structuur van biomoleculen waarmee deze stof belangrijke interacties aangaat. Het meest voor de hand liggende voordeel van *in silico* methoden is dat ze al kunnen worden toegepast wanneer een stof alleen nog maar bedacht is en dus nog niet is gesynthetiseerd. De mogelijkheden van computertechnologie bij het onderzoeken van stofeigenschappen zijn echter breder dan deze omschrijving van *in silico* methoden doet vermoeden. Vaak bieden databases met informatie over grote aantallen in het verleden geteste stoffen, en bijbehorende zoekstrategieën goede mogelijkheden om een inschatting te maken van de eigenschappen van nieuwe stoffen. Ook wordt in toenemende mate gekeken naar computermethoden die op basis van *in vitro* gegevens een voorspelling doen over de *in vivo* gedragingen van een stof.

De vraag die in deze bijdrage centraal staat is niet zozeer of computertechnologie een vervanging voor dierproeven kan zijn, maar vooral in hoeverre deze technologie kan bijdragen aan het verminderen en verfijnen van dierproeven. Deze vraag zal benaderd worden aan de hand van voorbeelden uit een drietal deelgebieden in het farmaceutische onderzoek namelijk opname, metabolisme<sup>1</sup> en toxiciteit van stoffen die mogelijk als geneesmiddel kunnen dienen. Afgezien van het beoogde therapeutische effect zijn de eigenschappen en effecten van nieuwe stoffen in deze drie categorieën meestal bepalend voor de toepasbaarheid van een stof als geneesmiddel. Deze categorieën van eigenschappen worden dan ook uitgebreid getest in proefdierexperimenten. Hieronder zal na een korte beschrijving van de processen en

1 De omzetting van een stof in andere stoffen, zoals afbraakproducten.

relevante stofeigenschappen worden aangegeven in hoeverre computer-modellen dierexperimentele studies kunnen vervangen, verminderen of aanvullen.

### **Opname**

Een goede opname van de stof door het lichaam (meestal bij voorkeur via orale toediening) is een belangrijke farmacokinetische eigenschap<sup>2</sup> voor de succesvolle ontwikkeling van een geneesmiddel. In de praktijk worden dan ook met veel kandidaat-geneesmiddelen farmacokinetische studies uitgevoerd in proefdieren, veelal in ratten en muizen, voordat uiteindelijk slechts een zeer klein deel geselecteerd wordt voor studies in de mens. Of een stof efficiënt wordt opgenomen hangt af van verschillende eigenschappen, die deels op basis van chemische structuur berekend kunnen worden.

De mate waarin en snelheid waarmee een stof wordt opgenomen in het bloed hangt voor een belangrijk deel af van de fysisch-chemische eigenschappen van een stof. Stoffen dienen allereerst voldoende opgelost te zijn, voordat ze via de maag en/of darmwand kunnen worden opgenomen in de bloedbaan. Ook de mate waarin en via welk mechanisme de stof de darmwand passeert is grotendeels afhankelijk van fysisch-chemische eigenschappen zoals lipofiliciteit (de mate waarin een stof in vetachtige stoffen oplost), ionisatie (de sterkte van zure en basische groepen) en de grootte en flexibiliteit van het molecuul. Deze eigenschappen kunnen niet alleen met eenvoudige laboratoriumexperimenten bepaald worden, ze kunnen over het algemeen ook goed met computerberekeningen worden voorspeld. Methoden voor het voorspellen van orale absorptie zijn dan ook vaak gebaseerd op empirisch afgeleide relaties tussen (berekende) fysisch-chemische eigenschappen en de gemeten absorptie. Zij geven meestal een kwalitatieve indicatie over de geschiktheid van de stof voor orale opname. Een bekend voorbeeld is de zogenaamde “rule of five” (Lipinski et al., 1997). Deze regel is gebaseerd op een analyse van meer dan 2000 orale geneesmiddelen, waarvan de vier meest relevante fysisch-chemische eigenschappen binnen bepaalde grenswaarden bleken te liggen.<sup>3</sup> Buiten deze grenzen, zo stelt de hieruit afgeleide regel, neemt de kans op een goede orale absorptie af.

2 Eigenschappen die het verdelingsgedrag en het verloop van de concentraties van een farmacologisch actieve stof in een lichaam bepalen.

3 Namelijk molecuul gewicht  $\leq 500$ ,  $\log P \leq 5$ , aantal waterstofbrug donoren  $\leq 5$  en aantal waterstofbrug-acceptoren  $\leq 10$ ).

Recentelijk is binnen Organon een evaluatie uitgevoerd waarin voorspellingen van de orale absorptie van stoffen door middel van verschillende *in silico* methoden zijn vergeleken met *in vivo* gemeten orale absorpties in de rat, welke de orale absorptie in de mens goed voorspelt. Deze evaluatie betrof onder andere een variant op de hierboven genoemde “rule of five”, waarbij ook nog twee andere eigenschappen<sup>4</sup> o.a. als maat voor de moleculaire flexibiliteit werden meegewogen. De stoffen die door deze *in silico* methode als ongeschikt voor orale absorptie werden geclassificeerd bleken in de dierproeven ook inderdaad, op één enkele uitzondering na, een lage orale absorptie en biobeschikbaarheid<sup>5</sup> te laten zien. Dit voorbeeld geeft aan dat relatief eenvoudige modellen kunnen worden gebruikt voor het bewerkstelligen van een reductie van het aantal dierproefexperimenten. De *in silico* methode kan het proefdierexperiment in het genoemde voorbeeld echter niet volledig vervangen. Een aanzienlijk deel van de stoffen die op basis van de berekende fysisch-chemische eigenschappen als geschikt voor orale absorptie werden geclassificeerd bleken toch *in vivo* een lage orale biobeschikbaarheid te hebben. Bij deze stoffen was het dierproefexperiment dus nog steeds essentieel om de ongeschiktheid als geneesmiddel in het selectieproces aan te tonen. Verschillende aspecten spelen hier mogelijk een rol. De orale absorptie kan bijvoorbeeld sterk worden beperkt door de oplosbaarheid van een stof. Dit aspect wordt niet volledig meegenomen in hierboven berekende eigenschappen. Het voorspellen van oplosbaarheid op basis van moleculaire structuur is theoretisch lastig en in de praktijk nog relatief onbetrouwbaar. Ook het metabolisme van de stof heeft (zowel in de darmwand als in de lever) een belangrijk effect dat niet in de bovengenoemde eigenschappen is meegenomen. Op metabolisme zal in de volgende sectie verder worden ingegaan.

Meer geavanceerde modellen voor het voorspellen van de farmacokinetiek van stoffen zijn sterk in ontwikkeling. Zogenaamde “physiologically based pharmacokinetic models” (PBPK modellen) zijn opgebouwd uit compartimenten voor de bloedsomloop en de relevante organen. In deze modellen wordt het gedrag van een stof niet alleen bepaald door stofafhankelijke parameters zoals oplosbaarheid, de opnamesnelheid vanuit de darm, partitioefficiënten<sup>6</sup> voor de verschillende organen en de intrinsieke metabole

4 Het berekende polaire oppervlak van een molecuul en het aantal roteerbare bindingen.

5 De effectieve beschikbaarheid in een biologisch systeem.

6 Parameter die de verdeling van een stof over verschillende compartimenten weergeeft.

klaring<sup>7</sup>, maar ook door systeemafhankelijke parameters zoals volumes van elk compartiment. De stofafhankelijke parameters kunnen deels worden geschat aan de hand van structuur-eigenschap relaties (zoals lipofiliciteit en zuur/base eigenschappen), en deels kunnen ze experimenteel worden afgeleid, bijvoorbeeld door middel van *in vitro* experimenten (bijvoorbeeld oplosbaarheid en metabole stabiliteit van een stof). Vervolgens kunnen de opname vanuit het maag-darm kanaal naar het bloed, de verdeling van de stof over de organen en afbraak en eliminatie van de stof worden gesimuleerd in de tijd. Dit resulteert in een voorspelling van de bloedplasma-concentraties van de stof in de tijd en de hiermee gerelateerde farmacokinetische parameters zoals biobeschikbaarheid en klaring.

Hoewel deze modellen proefdieren (nog) niet kunnen vervangen, kunnen ze al wel gebruikt worden voor een meer gedetailleerde analyse van de resultaten uit *in vivo* experimenten. Zo kunnen bijvoorbeeld parameters in een voorspellend model worden vergeleken met data uit experimenten. Resulterende inzichten kunnen helpen bij het zoeken naar varianten van deze stoffen met verbeterde farmacokinetische eigenschappen.

## **Metabolisme**

Het is in farmaceutisch onderzoek om meerdere redenen van belang om het metabolisme van een (potentieel) geneesmiddel in kaart te brengen. De snelheid van metabolisme bepaalt hoe lang een stof in een actieve concentratie in het lichaam aanwezig blijft en dus of een praktisch doseringsschema mogelijk is. Soms kunnen stoffen worden omgezet in toxische metabolieten<sup>8</sup>. Ook de vraag welke specifieke enzymen bij het metabolisme betrokken zijn, is belangrijk. Sommige enzymen zijn in zeer verschillende mate aanwezig en actief in verschillende mensen, afhankelijk van genetische factoren of van het gebruik van andere geneesmiddelen. Stoffen die voor hun metabolisme uitsluitend van deze enzymen afhankelijk zijn, gedragen zich hierdoor anders bij verschillende patiënten en zijn daarom onwenselijk. Computersystemen dragen op verschillende wijze bij aan het voorspellen en begrijpen van het metabolisme. In de eerste plaats zijn er databasesystemen die een belangrijk hulpmiddel vormen. Een voorbeeld is de “MDL Metabolite database” waarin de metabole omzetting van honderden geneesmiddelen met afzonderlijke reactiestappen zijn opgeslagen.<sup>9</sup> Deze

7 De snelheid van omzetting van een stof in afbraakproducten.

8 Afbraakproducten.

9 <http://www.mdl.com/products/predictive/metabolite/>



database kan gebruikt worden om een idee te krijgen hoe nieuwe stoffen mogelijk worden omgezet. Men kan bijvoorbeeld metabole routes van gelijksoortige stoffen bestuderen of men kan de database gericht doorzoeken op (omzettingen van) structurelementen uit de nieuwe verbinding.

Andere computermethodes voorspellen mogelijke afbraakproducten op basis van reactieregels. Een dergelijke regel stelt bijvoorbeeld dat wanneer een molecuul een hydroxyl groep bevat deze geglucuronideerd<sup>10</sup> kan worden. Wanneer voor alle algemeen voorkomende reacties regels aanwezig zijn en metabole routes van meerdere reactiestappen worden verwerkt, resulteren deze methodes al snel in grote aantallen van voorspelde metabolieten en het is dan ook essentieel om hierin een rangschikking aan te brengen. Een goede benadering is om op basis van de frequenties van reacties in een database voorspellingen te verfijnen en te rangschikken.

Computervoorspellingen van metabolieten zijn niet alleen een hulpmiddel bij het ontwerpen van nieuwe stoffen met verbeterde metabole eigenschappen, ze kunnen ook ondersteuning bieden bij de analyse van experimentele resultaten. Bij experimentele identificatie van metabolieten in biologische monsters wordt vaak gebruik gemaakt van massaspectroscopische detectie. Met name bij heterogeen samengestelde monsters afkomstig uit *in vivo* experimenten kan het detecteren van metabolieten sterk vereenvoudigd worden door gericht te zoeken naar voorspelde massa's en fragmentatiepatronen van stoffen. Met zo een gerichte detectie wordt een snelle screening op metabolieten mogelijk in monsters uit *in vitro* metingen of uit dierproefexperimenten, waarmee waardevolle extra informatie kan worden verkregen.

Geavanceerdere computermodellen kunnen ook worden gebruikt om inzicht te krijgen in de interactie van geneesmiddelen met specifieke enzymen die een rol spelen in het metabolisme. Van deze metabole enzymen komen steeds meer 3-dimensionale structuren beschikbaar, verkregen met behulp van röntgen kristallografie. Van de meest belangrijke familie van metabole enzymen, Cytochroom P450, zijn recentelijk de structuren van een aantal menselijke varianten opgehelderd. Van varianten waarvan nog geen structuur bekend is, kunnen met behulp van computertechnieken 3-dimensionale modellen gemaakt worden.

Deze experimentele en voorspelde 3D structuren kunnen gebruikt worden om de binding van (potentiële) geneesmiddelen aan deze eiwitten te simu-

10 Een metabole omzetting door glucuronyl transferase enzymen die tot detoxificatie van de stof leidt.

leren. Naast binding aan enzymen, bepaalt ook de chemische reactiviteit van de stoffen zelf welke metabole reacties kunnen optreden. Chemische reactiviteit kan met theoretische (op quantumchemie gebaseerde) berekeningen worden voorspeld. De combinatie van enzym simulaties en berekeningen van reactiviteit kan een goede indicatie geven welk deel van een molecuul gemetaboliseerd wordt. Tevens kan het helpen bij het vinden van aangepaste stoffen met betere metabole eigenschappen.

### **Toxiciteit**

Een belangrijk doel waarvoor proefdierexperimenten worden ingezet in farmaceutisch onderzoek is het inschatten van het risico op toxische effecten voordat een stof in de mens wordt getest. Tegelijkertijd is toxiciteit moeilijk op alternatieve wijze te achterhalen vanwege de vele verschillende en soms onvoorziene mechanismen die hierbij een rol kunnen spelen. Computer methoden kunnen ingezet worden om vooraf het risico op bepaalde soorten toxiciteit in te schatten. Op basis hiervan kan worden gezocht naar geneesmiddel-kandidaten met een verlaagde kans op toxische effecten in de uiteindelijke proefdierexperimenten. Ook kan het helpen om het (experimentele) onderzoek naar de mogelijke toxiciteit van een stof in eerste instantie op voorspelde risico's te richten en deze uit te sluiten alvorens andere (dierproef)experimenten uit te gaan voeren.

In de eerste plaats zijn ook hier elektronische databases belangrijk om de groeiende kennis over toxiciteit van stoffen op bruikbare wijze beschikbaar te maken. Verscheidene databases met toxiciteitsgegevens zijn publiek toegankelijk gemaakt via Internet<sup>11</sup>. Daarnaast zijn ook databases te koop die voorzien zijn van geavanceerde zoekprogramma's. Hiermee kan bijvoorbeeld gezocht worden op moleculaire substructuur of gelijkenis. De resultaten van een dergelijke zoekopdracht kunnen een idee geven van mogelijke risico's op de toxiciteit van een nieuwe stof. Soms kan de interpretatie lastig zijn als de gevonden toxiciteit niet duidelijk aan bepaalde chemische structurelementen toe te schrijven is.

Veel computermethoden zijn echter juist gebaseerd op dat soort structuur-toxiciteit relaties. Een bekend voorbeeld is het computer programma DEREK.<sup>12</sup> Dit programma controleert een ingevoerde chemische structuur op de aanwezigheid van groepen die gerelateerd zijn aan specifieke toxische

11 zie bijvoorbeeld <http://toxnet.nlm.nih.gov>

12 <http://www.lhasalimited.org/>

effecten, zogenaamde toxicoforen. De DEREK database (ook wel “knowledge-base” genoemd) bevat enkele honderden toxicoforen die gerelateerd zijn aan 40 typen toxiciteit. Een belangrijk deel hiervan betreft genotoxiciteit<sup>13</sup> en carcinogeniteit.<sup>14</sup> Een aantal recente publicaties laat zien dat, hoewel programma’s als DEREK goed in staat zijn mutagene stoffen<sup>15</sup> op te pikken uit de publiek beschikbare datasets, in het farmaceutische onderzoek van veel geteste stoffen de mutagene eigenschappen niet konden worden voorspeld (Greene, 2002; Cariello et al., 2002; Snyder et al., 2004). Dit heeft mogelijk te maken met het feit dat de bekende toxicoforen voor mutageniteit vooral zijn gebaseerd zijn op reactieve groepen die reacties kunnen aangaan met het DNA, terwijl geneesmiddelachtige stoffen ook mutageen kunnen zijn door andere interacties met DNA (bijvoorbeeld DNA intercalatie) wat minder direct aan moleculaire substructuur is te relateren (Snyder et al. 2005).

De kwantitatieve voorspelling van de toxiciteit wordt bemoeilijkt doordat er verschillende mechanismen aan ten grondslag kunnen liggen. Voorspellingen kunnen dan niet op één algemeen model gebaseerd zijn. Dit is bijvoorbeeld terug te zien in modellen voor acute toxiciteit. Een voorbeeld hiervan is een model van Pharma Algorithms dat een voorspelling doet van de LD50 (de dosis die in 50% van de gevallen dodelijk is) op grond van de moleculaire structuur (Zmuidinavicius et al. 2003). Dit model controleert eerst of de te voorspellen verbinding behoort tot bepaalde stofklassen die via specifieke mechanismen acute toxiciteit kunnen vertonen.<sup>16</sup> Vervolgens wordt de LD50 waarde voorspeld op basis van een “kwantitatieve structuur-toxiciteits relatie” die specifiek is voor de stofklasse. Stoffen die niet behoren tot één van deze specifieke stofklassen (zoals verreweg de meeste geneesmiddelen, of geneesmiddelkandidaten) worden geclassificeerd aan de hand van fysisch-chemische eigenschappen<sup>17</sup> en afhankelijk hiervan wordt een specifieke structuur-toxiciteits relatie toegepast. Een factor die de acute toxiciteit van een stof sterk beïnvloedt is de manier waarop (en de snelheid waarmee) een stof wordt gemetaboliseerd. Dit wordt vaak, zoals ook in het hierboven beschreven model, niet expliciet meegenomen. Ook bij het voorspellen van acute toxiciteit na orale toediening moet de mate waarin de stof wordt opgenomen, worden verdisconteerd.

13 DNA-beïnvloedend.

14 Kankerverwekkend.

15 Mutatieveroorzakend.

16 Bijvoorbeeld acetylcholinesterase remmers, organometaal verbindingen en reactieve alkylende verbindingen.

17 basisiteit, logP en molecuulgewicht.

Wanneer de oorzaak van bepaalde toxiciteit kan worden toegeschreven aan zeer specifieke interacties met bepaalde componenten in het lichaam, vergroot dit de mogelijkheden om succesvol computermodellen in te zetten. Een voorbeeld hiervan is het risico dat een geneesmiddel hartritme stoornissen veroorzaakt, zoals het zogenaamde “Torsade de pointes” (TdP) door de blokkade van een celmembraaneiwit in het hartweefsel, het zogenaamde “hERG” ionkanaal. Het vermogen van een stof om het hERG kanaal te blokkeren kan ook *in vitro* worden getest en dit gebeurt dan ook in een vroege fase van het onderzoek naar nieuwe stoffen. Zodoende kan het onderzoek gericht worden op stoffen die de minste kans op hartritme problemen geven in latere dierstudies. Naast deze *in vitro* experimenten wordt ook aan computermodellen gewerkt die interactie met hERG kunnen voorspellen. Deze modellen variëren van eenvoudige beslisbomen op basis van enkele te berekenen moleculaire eigenschappen tot meer ingewikkelde modellen die gebaseerd zijn op een hypothetische 3-dimensionale structuur van het ion-kanaal. In de praktijk van het onderzoek binnen Organon blijkt het eenvoudige beslisboommodel al bruikbaar om stoffen met een grote kans op hERG blokkades, te identificeren.

### **Validatie**

Het succes van computertechnieken als alternatief voor en de ondersteuning van proefdierexperimenten hangt af van de betrouwbaarheid van de modellen. Validatie van deze modellen is dan ook een eerste voorwaarde richting acceptatie van computervoorspellingen als alternatief voor dierexperimenten. Hierbij moet in overweging genomen worden dat *in silico* methoden vaak op structuur-activiteit relaties zijn gebaseerd. Voor nieuwe stofklassen, waarvoor een model niet getraind en getest is, is er minder garantie op betrouwbare voorspellingen. Essentieel bij de ontwikkeling en validatie van *in silico* modellen is de beschikbaarheid van voldoende experimentele data, in het bijzonder wanneer het statistische structuur-activiteit relaties betreft. Databases waarin gegevens uit zoveel mogelijk bronnen op uniforme wijze worden opgeslagen, zijn daarbij van groot belang.

Daarnaast zullen binnen onderzoeksorganisaties modellen gevalideerd moeten worden voor de specifieke stofklassen waarmee gewerkt wordt. Dit vraagt om goed beheer van de intern verkregen experimentele resultaten. *In silico* methoden kunnen dan niet alleen gevalideerd worden op geldigheid voor de relevante stofklassen; in het meest optimale scenario zou ook een permanente terugkoppeling met nieuwe experimentele resultaten toegepast kunnen worden waardoor *in silico* modellen voortdurend worden

verbeterd. Op deze wijze kunnen zij een geïntegreerd onderdeel gaan uitmaken van het onderzoek naar stoffen met de gewenste eigenschappen.

## Conclusie

Proefdierexperimenten zijn in het farmaceutisch onderzoek een onmisbaar onderdeel, variërend van het verkrijgen van essentiële inzichten in het ziekteproces, en mogelijke aangrijpingspunten daarin, tot het beoordelen van toxiciteit en benodigde dosering van kandidaat-geneesmiddelen. Er zijn echter belangrijke ontwikkelingen gaande die niet zozeer op vervanging maar veel meer op verfijning en vermindering van proefdierexperimenten gericht zijn. Door de ontwikkeling van *in silico* en *in vitro* experimenten kunnen stoffen met een grote kans op ongewenste eigenschappen vroegtijdig worden geïdentificeerd en uitgesloten worden voor verder onderzoek. *In silico* voorspellingen kunnen hierbij al van dienst zijn, zelfs voordat een nieuwe verbinding gesynthetiseerd is. Chemici kunnen zo bij het ontwerpen van nieuwe stoffen al een idee krijgen van hoe een stof zich *in vivo* zal gedragen.

Een belangrijke rol van computermodellen is ook het verschaffen van inzicht in de structuur-activiteit relatie zodat (“het ontwerp van”) stoffen met kleine chemische modificaties verbeterd kunnen worden. Uiteindelijk zullen deze ontwikkelingen ertoe moeten leiden dat minder stoffen in proefdieren getest hoeven te worden en dat een kleiner deel van de stoffen die getest worden daarbij ongewenste effecten laten zien.

## Referenties

- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy B. W. & Feeney P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23: 3-25.
- Greene, N. (2002) Computer systems for the prediction of toxicity: an update. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 : 417-431
- Cariello, N.F., Wilson, J.D., Britt, B.H., Wedd, D.J., Burlinson, B. & Gombar, V. (2002) Comparison of the computer programs DEREK and TOPKAT to predict bacterial mutagenicity. Deductive Estimate of Risk from Existing Knowledge. *Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology. Mutagenesis* 17: 321-9
- Snyder, R.D., Pearl, G.S., Mandakas, G., Choy, W.N., Goodsaid, F. & Rosenblum, I. (2004) Assessment of the sensitivity of the computational programs DEREK, TOPKAT, and MCASE in the prediction of the genotoxicity of pharmaceutical molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* 43: 143-458
- Snyder, R.D. & Hendry, L.B. (2005) Toward a greater appreciation of noncovalent chemical/DNA interactions: application of biological and computational approaches. *Environ. Mol. Mutagen.* 45: 100-105
- Zmuidinavicius, D., Japertas, P., Didziapetris, R. & Petrauskas, A. (2003) Progress in Toxinformatics: The Challenge of Predicting Acute Toxicity. *Curr. Topics Med. Chem.* 3: 1301-1314

# Dierproeven in het Onderwijs

*René Remie en Jan van der Valk*

Van oudsher was het onderwijs in de biomedische disciplines deels gebaseerd op demonstraties en deels op practica waarbij gebruik gemaakt werd van menselijk of dierlijk weefsel, en van proefdieren al dan niet intact, wakker of onder anesthesie. Deze vorm van aanschouwelijk onderwijs werkte, in de tijd dat boeken schaars waren en computers hun intrede nog niet hadden gedaan, naar volle tevredenheid. Door de huidige ideeën in de maatschappij over het doen van dierproeven, door nationale en internationale wetgeving en de ontwikkelingen op het gebied van de 3 V's (vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven) is het uitvoeren van dierexperimenten voor wetenschappelijk onderzoek of onderwijs niet meer vanzelfsprekend.

In de praktijk komt dit o.a. tot uiting doordat dierexperimentencommissies (DEC's) een positief advies moeten hebben gegeven voordat een experiment met proefdieren, zowel voor onderzoeks- als onderwijsdoeleinden, doorgang kan vinden. Daarnaast is er aandacht en zijn er financiën voor de ontwikkeling en toepassing van 3 V modellen die leiden tot vervanging, vermindering of verfijning van dierexperimenten, in de wandelingen ook wel alternatieven voor dierproeven genoemd.

Al met al hebben diverse ontwikkelingen over de jaren geleid tot een vermindering van het aantal dierproeven in Nederland. Echter, in het onderwijs zien we juist een omgekeerde trend, vanaf 1997 stijgt het aantal proefdieren binnen het onderwijs in Nederland weer gestaag (Tabel 1). Het is nog onduidelijk wat hieraan ten grondslag ligt. Hoe de trend is op Europees niveau is vooralsnog onduidelijk door andere registratie-eisen. Voor de Europese registratie hoeven dieren die gedood worden zonder voorafgaande handeling niet geregistreerd te worden. Dieren die dus speciaal zijn gefokt voor dissectie en/of anatomiepractica zijn niet terug te vinden in de Europese registratie.

Onderwijs is niet alleen een moment om kennis en handvaardigheden bij te brengen, maar ook om studenten hun mening te laten vormen, kennis te laten nemen van de praktijk en om hun attitude, in dit geval t.o.v.

proefdieren, verder te laten vormen. Het wekt dus bevreemding dat in een maatschappij en wetenschappelijke omgeving waar het doen van dierproeven niet meer vanzelfsprekend is, het proefdiergebruik in de leeromgeving toeneemt. Het lijkt alsof de kracht van de traditie en de onwil het vertrouwde in de steek te laten ten gunste van de verandering een snelle omwenteling in de weg te staan. Zo worden studenten in de biomedische richtingen (farmacie, biologie, geneeskunde, biomedische wetenschappen) in de bachelor fase, of fase die daarmee vergelijkbaar is, vaak geconfronteerd met proefdieren zonder dat dat door middel van een ethische of maatschappelijke beschouwing wordt toegelicht. Met andere woorden, de studenten krijgen een beeld van het uitvoeren van dierproeven dat niet strookt met de werkelijkheid. Pas als men de proefdierkundecursus (ex. Art.9 Wod) volgt, in een later deel van de studie of vaak zelfs pas na het afstuderen, wordt men op de hoogte gebracht van de realiteit rond het doen van dierproeven.

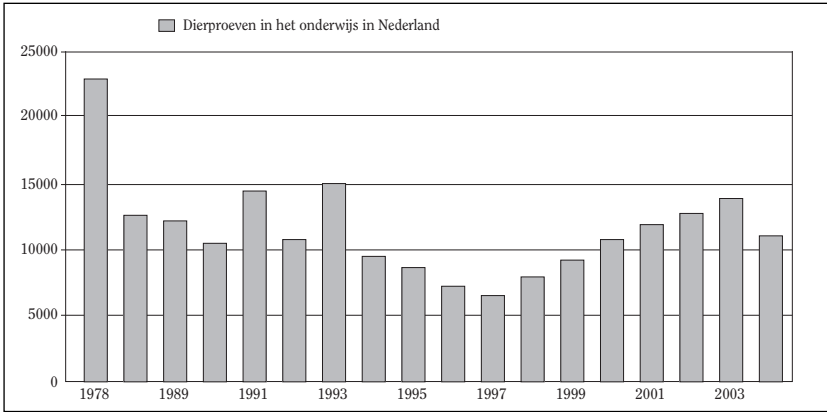
In dit essay wordt getracht handvaten te bieden waarmee de DEC's, maar de alternatievenexpert in het bijzonder, aangevraagde dierproeven voor onderwijsdoeleinden kan toetsen.

### **Dierproeven in het onderwijs**

In het wetenschappelijk onderwijs zijn er van oudsher een aantal studierichtingen waar men gebruik maakt van proefdieren. Vakgebieden als diergeneeskunde, chirurgie, fysiologie, farmacologie, anatomie en traumatologie zijn daarvan het meest bekend. Dieren worden in deze disciplines op veel verschillende manieren toegepast. De leerdoelen zijn vaak divers:

- Het eigen maken en oefenen van laboratoriumvaardigheden:
  - Algemene vaardigheden
  - Diergerelateerde handeling
  - Chirurgische- of dissectievaardigheden
- Het verwerven van nieuwe kennis en repeteren van aanwezige kennis
- Het leren experimenteren inclusief het verzamelen van gegevens, data-analyse en interpretatie
- Presentatievaardigheden, mondeling en schriftelijk (dit zijn algemene niet dierproefafhankelijke vaardigheden)
- Het ontwikkelen van een verantwoordelijkheid ten opzichte van proefdieren

Toch is het gebruik van dieren in het biomedische onderwijs niet overal toegestaan. Zo is in Engeland het gebruik van levende dieren door studenten



*Figuur 1. Dierproeven in het onderwijs in Nederland van 1978 tot 2004. Boven het totaal aantal dierproeven in het onderwijs, onder uitgedrukt in procenten van het totale aantal dierproeven. (Bron: Zo Doende, 1990 t/m 2004)*

om te oefenen of om een vaardigheid te trainen, verboden. Zij kunnen hun vaardigheden op peil brengen door eerst te assisteren en langzaam aan bepaalde handelingen zelf uit te voeren op de patiënten. Uitzondering hierop vormt de training in de microchirurgie (Oelsner et.al. 1985; U.K. Home Office, 1985). Als reden hiervoor wordt gegeven dat het onmogelijk is deze verfijnde technieken op kadavermateriaal te oefenen. Uit eigen ervaring blijkt echter dat de stap van kadaver naar levend dier niet ineens gemaakt hoeft te worden, maar daarover later meer.

### **Specialisatie**

Met de komst van verregaande specialisatie binnen vrijwel elke studierichting wordt het inderdaad weer tijd eens kritisch naar de dierproef in het onderwijs te kijken. Moet elke bioloog praktische vaardigheden opdoen bij het bestuderen van dieranatomie? Moet een student diergeneeskunde chirurgische vaardigheden op proefdieren trainen? Als eerste reactie hoor je vaak dat dit een onlosmakelijk onderdeel van de studie moet zijn. Een bioloog die zelf geen praktische anatomische vaardigheden heeft zou geen bioloog moeten heten! Of, in het geval van de veterinaire, geeft men aan dat men de kat niet ter sterilisatie zal brengen naar een dierenarts die voor het eerst een operatie op een levend dier uitvoert. Nog één; is het nuttig om een farmaceut in zijn derde studiejaar met dierproeven te confronteren terwijl die student van plan is te specialiseren in de richting van bijvoorbeeld de kwaliteitscontrole van geneesmiddelen? Vermoedelijk zullen velen deze vra-



gen ontkennend beantwoorden. Maar wat nu bij een student die nog geen duidelijk beeld van zijn toekomst heeft. Hier zou de confrontatie met een dierproef richtinggevend kunnen aan zijn of haar specialisatiekeuze zijn. Het kan dus ook duidelijkheid scheppen.

Naarmate het duidelijker wordt welke specialisatie een student gaat volgen, is de beslissing dierproeven al dan niet in een curriculum op te nemen, beter te onderbouwen. In geval dat dierproeven onvermijdelijk met het toekomstige beroep verbonden blijven, zal het ook een essentieel deel blijven van de beroepsopleiding. Een fasering van de opleiding in een deel waarin uitsluitend alternatieven voor dierproeven worden gebruikt om de leerstof te illustreren, zou tegemoet komen aan de veel gehoorde klacht van studenten dat zij er later toch niets mee gaan doen. Aan de andere kant kunnen studenten, die bewust de dierexperimentele kant op willen, doelgericht getraind worden. We zien dus dat er door de verregaande specialisatie niet meer zo iets bestaat als “de bioloog” of “de dierenarts” of “de farmaceut”. De maatschappij zal daar verder aan moeten wennen. Werkgevers baseren hun keuzes voor nieuwe medewerkers tegenwoordig al in belangrijke mate op de gevolgde specialisatie.

We zijn voor het gemak nu wel even snel voorbij gegaan aan de alternatieven in het onderwijs, die een groot deel van het hiaat zouden kunnen dichtten.

### **De alternatieven**

De volgende categorieën van alternatieven kunnen worden onderscheiden (Jukes & Chiuiua, 2003):

- Films en video's
- Modellen en simulatoren
- Multimedia computersimulaties
- Dode dieren die op een ethische manier zijn verkregen (dieren die een natuurlijke dood zijn gestorven of zijn geëuthaniseerd)
- Klinisch werk in de praktijk op dieren, patiënten en vrijwilligers
- Zelf-experimentatie van studenten
- *In-vitro* onderzoek
- Internet

Niet alle training is compleet te vervangen door alternatieven. Vaak kan een alternatief ingezet worden in de initiële fase van een training. Het gaat er op dat moment om de student de grondbeginselen van een handeling bij te

brengen. We moeten hier denken aan bepaalde laboratoriumtechnieken (afname van lichaamsvloeistoffen, toedienen van injecties etc.), het hantieren van dieren, dissectie en chirurgische technieken.

### **Emotie en zorg voor het dier door het scheiden van technieken**

In andere, niet diergebonden beroepen, wordt in toenemende mate gebruik gemaakt van training op simulatoren (luchtvaart, scheepvaart, rijvaardigheidstraining). Ook in het dierexperimenteel onderzoek neemt de toepassing van simulatoren voordat men aan het dier gaat praktiseren, toe. Gebruik van dergelijke alternatieven in de initiële training leidt onder andere tot minimalisering van pijn en ongerief bij de uiteindelijk gebruikte dieren, van het diergebruik en van stress bij de studenten, en tot optimalisering van het leren.

Het voordeel van deze benadering is dat de student zich kan concentreren op het aanleren van de op dat moment essentiële handelingen. De op dat moment emotioneel belastende zaken als zorg voor het dier in het kader van de anesthesie, vochthuishouding (voorkomen van bloedingen etc.) vertroebelen de kernboodschappen en handelingen dan niet.

### **Effectiviteit van alternatieven ten opzichte van dierproeven**

Veel docenten die dierproeven aanbieden argumenteren dat de werkelijkheid getoond moet worden en dat de realiteit meer impact heeft op de student, waardoor de student de leerstof beter onthoudt. “Jaren later herinneren de studenten zich nog mijn practicum”, is een veelgehoord argument. Is dit werkelijk zo? Navraag leert dat de dierproeven inderdaad beter in het geheugen blijven hangen. Echter, wanneer expliciet wordt gevraagd waar het practicum uit het verleden over ging en wat men heeft geleerd, moet men veelal het antwoord schuldig blijven. De vraag is dus of dierproeven wel zo effectief zijn en of alternatieven wat leereffecten betreft niet net zo goed kunnen werken.

Er is in het verleden enkele malen onderzoek gedaan naar het leereffect van een dierexperimenteel practicum en dat van een proefdiervrije methode. Uiteraard hangen de resultaten af van de kwaliteit van het model en de wijze waarop het model in de leersituatie is ingepast. De resultaten komen over het algemeen overeen (Dewhurst et al., 1994):

- Veel, maar niet alle leerdoelen kunnen worden bereikt met alternatieven;
- Het opdoen van kennis is vergelijkbaar;

- *Data handling* en experimentele set-up kunnen goed worden geleerd met alternatieven;
- Studenten zijn over het algemeen positief over de aangeboden alternatieven;
- Een kostenbesparing op de inzet van staf en biotechnici en materiaal;
- Er is betere ondersteuning voor de zwakkere student.

In enkele publicaties zijn resultaten gepubliceerd van modellen die het beter deden dan de originele dierproef (Fawver et al., 1990; Griffon et al., 2000). Een meer recent onderzoek (Hughes, 2001) toont aan dat de computersimulatie in vergelijking met de dierproef op het praktische onderdeel beter en op het theoretische onderdeel vergelijkbaar scoorden. Er was echter ook enige evidentie dat bij studenten die dierproeven hadden uitgevoerd op langere termijn mogelijk betere leereffecten werden bereikt.

### **De voordelen van alternatieven**

Ten opzichte van dierexperimenteel onderzoek in het onderwijs hebben alternatieven toch vele voordelen. In de eerste plaats zijn experimenten met proefdierlijke modellen meerdere keren te herhalen en deze zijn vaak ook onafhankelijk van tijd of plaats te gebruiken. Het gebruik van deze modellen leidt tot succesvolle experimenten. Een aantal modellen hebben een feed-back systeem ingebouwd. Daarnaast kunnen met modellen en zeker computeranimaties processen worden gedemonstreerd die in een diermodel onmogelijk zijn. Vergeleken met proefdieren zijn proefdierlijke modellen op termijn goedkoper. Als laatste hoeft er minder student-docent interactie plaats te vinden.

Bij dierproeven zien we vaak dat de onervaren studenten geprepareerd weefsel in handen krijgen om experimenten uit te voeren. Studenten vragen tijdens het experiment veel aandacht van de docent, omdat men bang is het preparaat onherstelbaar te beschadigen. Hoewel deze angst bijdraagt aan de attitudevorming ten aanzien van dieren, biedt een computersimulatie meer mogelijkheden om de gestelde leerdoelen te bereiken. Met de simulatie heeft de student veel meer mogelijkheden om diverse experimenten uit te voeren, ook die waarbij het echte preparaat onherstelbaar zou zijn beschadigd en het practicum voor die studenten zou zijn afgelopen. De studenten werken veel zelfstandiger, kunnen de effecten zien van “foute” behandelingen zonder het preparaat te verliezen en krijgen zo veel beter inzicht in de effec-

ten van de experimentele set-up op de resultaten (Braun, 2003). De docent moet overigens wel bereid zijn om het onderwijsonderdeel aan te passen en zijn rol anders in te vullen.

### **De nadelen van alternatieven**

Alternatieven moeten natuurlijk beantwoorden aan de eisen die gesteld worden aan wetenschappelijk onderwijs en aan training, waarbij onderwijs gezien moet worden in het licht van kennisoverdracht, terwijl training meer gericht is op het aanleren van handvaardigheden. De centrale vraag binnen het onderwijs blijft natuurlijk de kwestie van het rendement. Zit er meerwaarde in het gebruik van dieren en zo ja, rechtvaardigt dat het gebruik ervan? Als nadelen van computergebonden onderwijs worden vaak de volgende factoren genoemd:

*Biologische complexiteit.* Het is vrijwel onmogelijk om geïntegreerde interacties tussen weefsel en organen onderling te simuleren in een computerprogramma. We moeten hierbij natuurlijk bedenken dat een computerprogramma net zo “slim” is als de ontwerper ervan, die het gevoed heeft met de kennis van dat moment.

*Gemiste ervaringen.* Sommige docenten vinden dat studenten ervaring moeten hebben met levend weefsel.

*Biologische variabiliteit.* In het dierexperiment leren we de biologische variatie als vanzelf kennen. Computerprogramma's laten deze grote variatie nauwelijks zien.

*Houding van studenten.* Het gebruik van computerprogramma's zou een vorm van nonchalance induceren bij studenten, zodat het leerproces nadelig wordt beïnvloedt. Ook zouden studenten het als een soort spel zien en het programma maar opnieuw starten zodra er iets mis gaat. Daarnaast zou de student te veel op instrumenten vertrouwen en de “klinische blik” zou niet ontwikkeld worden.

Maar er zijn ook andere redenen waarom alternatieven niet altijd worden toegepast:

- Geen interesse in verandering;
- Tijd en geld nodig voor cursusaanpassing;
- Informatie over alternatieven niet goed beschikbaar;
- Kwaliteit varieert;
- Financiële, technische redenen om ze niet toe te passen;
- Niet inpasbaar zonder ingrijpende aanpassingen aan het onderdeel;

- Leerdoelen niet helemaal vergelijkbaar;
- “Not invented here” syndroom;
- Alternatief is niet ontwikkeld in 's lands taal.

Een mogelijke oplossing voor een aantal genoemde nadelen is het RECAL project van Dewhurst (Anon, 2006). Deze aanpak in verregaande staat van ontwikkeling moet het mogelijk maken dat de docent zelf het leermodel ontwikkelt. Bestaande computermodellen worden opgedeeld in modules en opgeslagen in een bibliotheek. Vervolgens kan de docent met behulp van speciaal ontwikkeld gereedschap modules aan elkaar smeden, eventueel met eigen teksten, tot een model dat aan de eigen leerdoelen tegemoet komt.

### **Onderwijs en de DEC**

Elke dierproef, dus ook die voor onderwijsdoeleinden, moet worden aangemeld bij een DEC en kan pas doorgang vinden na een positief advies. Men zou zich kunnen afvragen of de DEC's de aanvragen van dierexperimenteel werk in het onderwijs goed kunnen beoordelen. Over het algemeen lijken DEC's met dit soort aanvragen te worstelen. In tegenstelling tot wetenschappelijk onderzoek waar te bepalen eindpunten over het algemeen duidelijk gedefinieerd zijn, zijn leerdoelen voor practica, als ze er al zijn, over het algemeen vaag, niet duidelijk gedefinieerd en op verschillende manieren te interpreteren. Regelmatig wordt als argument gebruikt dat dierexperimenteel onderzoek in het betreffende vakgebied essentieel is en daarom alleen met proefdieren de kennis, ervaring of handvaardigheid kan worden overgebracht. Leerdoelen kunnen over het algemeen worden geschaard in een van de volgende categorieën (Nab, 1990):

- Het aanleren van feiten;
- Demonstreren van dynamische processen;
- Demonstreren van de complexiteit van een levend organisme;
- Aanleren van wetenschappelijke methoden / vaardigheden;
- Ontwikkelen van oplossingsgerichte capaciteiten;
- Stimuleren van onafhankelijk werken;
- Training in technische vaardigheden en handvaardigheden;
- Het ontwikkelen van een attitude tav dierexperimenteel onderzoek.

Daarnaast moet de DEC toetsen of aangemelde onderwijsonderdelen “uitsluitend ..... al dan niet rechtstreeks, gericht zijn op het belang van de gezondheid of de voeding van mens of dier” (art. 2. sub.2, Wod). Voor veel

aangemelde dierproeven in het onderwijs is in het bijzonder dit onderdeel moeilijk te toetsen. De ervaring binnen DEC's leert dat een gedeelte van de dierproeven binnen het onderwijs gegeven wordt omdat dat traditie is binnen een bepaald vakgebied. Het is regelmatig voorgevallen dat op het moment dat het betreffende practicum wordt overgenomen door een andere docent, of het curriculum wordt aangepast, dierproeven zonder slag of stoot worden vervangen. Het is daarom essentieel dat elke keer dat onderwijs met proefdieren wordt opgezet, docenten, maar ook curriculaleiders zich de volgende vragen stellen (van der Valk et al., 1999):

- Wat zijn de leerdoelen en waarom?
- Passen de leerdoelen binnen het curriculum?
- Zijn de leerdoelen en middelen van het aangevraagde experiment geschikt voor het betreffende onderdeel?
- Zijn de leerdoelen en middelen van het aangevraagde experiment geschikt voor de betreffende groep studenten?
- Zijn de leerdoelen en middelen van het aangevraagde experiment geschikt voor alle studenten van de groep?
- Is het gebruik van dieren de enige manier om de leerdoelen te bereiken?
- Is het gebruik van dieren de beste manier om de leerdoelen te bereiken?

Het hebben van een ouderejaars student als lid van de DEC kan bruikbare informatie opleveren over de uitvoering van een practicum, de relatie met de leerdoelen, het ingeschatte nut en de plaatsing in het curriculum. Er zou ook een duidelijke rol kunnen zijn voor het College van Bestuur van een Hogeschool of Universiteit. Zij zou richtinggevend kunnen zijn voor de docenten en in haar dierproevenbeleidsplan expliciet aandacht moeten besteden aan de wijze waarop zij alternatieven in het onderwijs in zou willen zetten. Een actief “Ja, mits...” of sterker nog een “Nee, tenzij...” beleid zou de introductie van alternatieven in het onderwijs in een stroomversnelling kunnen brengen. Daarnaast zouden faculteiten duidelijk inzicht moeten geven over diergebruik in bepaalde studierichtingen. Gewetensbezwaarden zouden hun standpunten in dat geval voor aanvang van hun studie kenbaar kunnen en moeten maken. De consequentie van de keuze van een studie dat dierproeven moeten worden gedaan, komt dan nooit meer als een verrassing voor de student. Aan de andere kant zouden studenten zelf ook consequent moeten zijn in hun keuzes. Zo is het moeilijk te rijmen dat farmaciestudenten die later in hun levensonderhoud gaan voorzien door de verkoop van op dieren geteste medicijnen, tijdens hun studie om ethische redenen geen dierproeven willen doen.

## **In de toekomst**

Alternatieven kunnen en moeten een belangrijke rol spelen bij de opleiding van studenten. Het zijn met name de tot nu toe diergebonden practica in de basisvorming van de studie die vaak vervangen kunnen worden door alternatieven. Naar mate de differentiatie toeneemt, wordt het vanzelf duidelijk of het uiteindelijke beroepsprofiel dierproeven wenselijk dan wel noodzakelijk maakt. Deze geleidelijke overgang passen we al geruime tijd toe bij de training van biotechnici, zoölogisch analisten, onderzoekers, veterinairen en klinisch chirurgen in de microchirurgie en experimentele technieken. Door in eerste instantie een scheiding aan te brengen tussen het aanleren van een techniek en het zorgen voor het dier tijdens de ingreep, blijkt de student zich veel meer op zijn/haar gemak te voelen. Vrij ingewikkelde technieken worden in kort tijdsbestek geleerd en geoefend tot er een bepaald niveau bereikt is. Vervolgens kan de student de zorg voor het dier erbij leren middels een computerprogramma (REMOTE II) dat een aantal vitale signalen op het scherm weergeeft en ad random problemen genereert die door de student opgelost moeten worden (perioperatieve zorg).

De stap naar het levende dier blijkt nu veel makkelijker gemaakt te worden, vroegtijdig sterven van de dieren door technisch falen is sterk gereduceerd en het percentage geslaagde ingrepen is bijzonder hoog. Het mes snijdt hier aan vele kanten, het spaart dierenlevens, de student voelt zich zeker over het eigen kunnen (geen disappointed learner syndroom), het is goedkoper en het gaat sneller. Dit principe van getrapte training kan in tal van vakgebieden toegepast worden, zowel binnen een bepaalde kortdurende cursus als ook in een jarenoverschrijdend curriculum.

Wanneer het gebruik van dieren in het onderwijs voor een practicum toch noodzakelijk wordt gevonden, worden door Smith and Smith (2004) de volgende principes voorgesteld:

- Het gebruik van dieren moet gelimiteerd worden tot de klinische fase van de studie (de fase waarin het intacte dier de werking moet laten zien);
- Studenten dienen zo vroeg mogelijk geïnformeerd te worden over de inhoud van het dierexperimentele onderdeel;
- Docenten dienen de studenten uit te leggen waarom voor het gebruik van proefdier is gekozen en waarom alternatieven niet of niet verder worden toegepast;
- Het onderwijs dient gericht te zijn op aspecten die ook vergelijkbaar zijn met andere species, waarbij de biologie, respect voor dieren, het hantieren en technieken met name aandacht krijgen;

- Docenten dienen niet alleen op de hoogte te zijn van de wetenschappelijke aspecten van het practicum, maar ook van dierenwelzijn en ethiek;
- Docenten dienen op de hoogte te zijn van mogelijke gezondheidsrisico's als gebeten worden, naaldprikken, allergieën, astma en flauwvallen.

In de gevallen dat de DEC besluit dat voor de aangevraagde dierexperimenten een positief advies wordt gegeven is het te overwegen dat alleen onder de voorwaarde te doen dat een korte inleiding wordt gegeven over het hoe en waarom van dierexperimenten voor deze toepassing, de wetgeving op dit gebied en de huidige opvattingen over het doen van dierexperimenteel onderzoek. Op deze wijze wordt de studenten getoond dat het uitvoeren van deze experimenten alleen onder bepaalde voorwaarden wordt toegestaan, wordt hen geleerd kritisch na te denken over het uitvoeren van dierproeven en wordt studenten die problemen hebben met dierproeven de gelegenheid geboden hierover van gedachten te wisselen. (Overigens hebben de meeste onderwijsinstututen in hun Onderwijs- en Examenreglement een artikel opgenomen die het mogelijk maakt dat studenten onder bepaalde omstandigheden het deelnemen aan een practicum kunnen weigeren.)

Door de wettelijke verplichting een cursus proefdierkunde te volgen is de bewustwording bij de onderzoekers sterk verbeterd. Er vanuit gaande dat deze groep onderzoekers de docenten van de toekomst zullen zijn, verwachten wij weinig problemen met de verdere invoering van alternatieven in het onderwijs. Echter, de uitvoering van de soms nog steeds noodzakelijke experimenten moet ook volgens de laatste standaarden gedaan worden. Hierbij is training van uitiem belang. Zouden we de dierproeven geheel uit het onderwijs schrappen, dan brengen we niet alleen het onderzoek in gevaar, maar veroorzaken we door onoordeelkundig handelen onacceptabel dierenleed en daar is niemand bij gebaat.

## Literatuur

- Anon (2006) <http://www.recal.mvm.ed.ac.uk/>
- Dewhurst D. G., Hardcastle J., Hardcastle P. T. & Stuart E. (1994). Comparison of a computer simulation program and a traditional laboratory practical class for teaching the principles of intestinal absorption. *American Journal of Physiology*, 267(6 Pt 3), S95-104.
- Braun H. (2003) Virtual versus real laboratories in life science education: Concepts and experiences. In: *From guinea pig to computer mouse* (Juliano R.L. and Chiuia M., red.). Leicester: InterNICHE, 81-86.
- Fawver A. L., Branch C. E., Trentham L., Robertson B.T. & Beckett S.D. (1990). A comparison of interactive videodisc instruction with live animal laboratories. *American Journal of Physiology*, 259(6 Pt 3), S11-14.



- Griffon D. J., Cronin P., Kirby B. & Cottrell D.F. (2000). Evaluation of a hemostasis model for teaching ovariohysterectomy in veterinary surgery. *Veterinary Surgery*, 29(4), 309-316.
- Hughes I. E. (2001). Do computer simulations of laboratory practicals meet learning needs? *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(2), 71-74.
- Jukes N. and Chiuia M. (2003) From guinea pig to computer mouse Leicester, UK: InterNICHE.
- Nab J. (1990). Reduction of animal experiments in education in the Netherlands. *Alternatives To Laboratory Animals*, 18, 57-63.
- Oelsner G., Boeckx W., Verhoeven H., Koninckx P, & Brosens I. (1985) "The Effect of Training in Microsurgery," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 152:1054-1058.
- Smith A.J. & Smith K. (2004) Guidelines for humane education: alternatives to the use of animals in teaching and training. *Alternatives To Laboratory Animals*, 32 (Suppl. 1A): p. 29-39.
- U.K. Home Office (1985) *Scientific Procedures on Living Animals*, Command 9521. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Valk J. van der, Dewhurst D., Hughes I., Atkinson J., Balcombe J., Braun H., Gabrielson K., Gruber F., Miles J., Nab J., Nardi J., Wilgenburg H. van, Zinko U., & Zurlo J. (1999) Alternatives to the Use of Animals in Higher Education, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 331. *Alternatives To Laboratory Animals*, 27, 39-52.

# Op zoek naar alternatieven voor dierproeven

Informatie met betrekking tot zoekprocessen en de keuze van de databases op het gebied van alternatieven voor dierproeven

*Theo Bakker*

In maart 1994, nog niet zo lang geleden dus, verscheen de publicatie van Cynthia P. Smith, "AWIC Tips for Searching for Alternatives to Animal Research and Testing". In deze publicatie wordt er vanuit gegaan dat in overleg met de onderzoeker een intermediaire informatiespecialist een zoekprofiel opstelt. Vervolgens worden door deze intermediair verschillende specifieke databases doorzocht. Nu, slechts enkele jaren later, moet de onderzoeker zelf het World Wide Web op om informatie te zoeken uit een enorme hoeveelheid aan bronnen en gegevens. *Publish or Perish* wordt nu voorafgegaan door *Search and Merge*. Om niet te verdrinken in de enorme veelheid aan informatie is het wellicht verstandig een kader te stellen in de vorm van "Wat (Hoe) zoek ik Waar". "Wat zoek ik" houdt een definitie van de vraagstelling in. Is de vraag enkelvoudig of bestaat de vraag uit meerdere facetten? Bestaan voor de vraagstelling specifieke trefwoorden of moet ik de vraag omschrijven? De logische volgende vraag is dan: "Waar zoek ik", dus wat zijn de voor de vraag relevante bronnen? Hieronder worden enkele aanwijzingen gegeven met betrekking tot het opstellen van een zoekvraag. Verder worden kort een aantal, meest relevante, databases besproken die in het biomedische veld betekenisvolle informatie kunnen opleveren.

## **Algemeen**

De Nederlandse Wet op de Dierproeven (Wod) uit 1977 (wijziging 1996) en het Dierproevenbesluit van 1985 (wijziging 1996) stelt dat 'het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundige heersende opvattingen, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef (Vervanging), of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt (Vermindering) of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is (Verfijning)'. Het genoemde is een directe afgeleide van de drie

R's (Reduction, Refinement en Replacement) zoals beschreven in "The Principles of Humane Experimental Technique" van Russell & Burch (1959). De in dit boek beschreven 3 V's, Vermindering, Verfijning en Vervanging zijn nog steeds de grondslag bij het zoeken naar alternatieven.

De Nederlandse wetgeving voorziet tevens in de verplichte aanmelding bij en toetsing van een dierexperiment door een Dierexperimenten Commissie (DEC). Conform de eerder genoemde drie V's dient een literatuuronderzoek, vooral in het kader van 'Vervanging', van deze aanmelding een onderdeel te zijn.

### **Literatuur zoeken**

Er zijn veel digitale gegevensbestanden met veel informatie over dierproefalternatieven beschikbaar via het internet (zie ook de bijlage van dit artikel waarin veel gebruikte databestanden kort worden beschreven. Bij het zoeken naar literatuur is het essentieel dat de zoekvraag wel overwogen is opgezet en dat relevante (effectieve) zoektermen worden toegepast. Hieronder volgen aanwijzingen hoe een zinvolle zoekvraag kan worden samengesteld.

- De zoekvraag dient in aanzet, flexibel en ruim gedefinieerd te worden. Alternatieven voor dierproeven zijn vaak niet of moeilijk als zodanig herkenbaar en het is daarom vaak nodig zoektermen te gebruiken die 'mogelijk' een alternatief opleveren, of informatie bevatten over 'Verfijning' of een nieuwe methode aandragen welke 'Vermindering' tot gevolg heeft.
- Elke database heeft een eigen trefwoordtoekenning. Wanneer hiermee geen rekening wordt gehouden dan zal dit de effectiviteit van de zoekvraag nadelig beïnvloeden. In dit verband moet daarom rekening worden gehouden met:
  - *homoniemen*: behavior en behaviour of haemoglobine en hemoglobine, etc.
  - *synoniemen*: hoewel de uitdrukking '*in vitro*' in literatuur over alternatieven voor dierproeven als een algemeen gebruikte zoekterm beschouwd kan worden, kan het nodig zijn om in een diepergaande zoekactie hieraan termen als cell-culture, tissue-culture, organ-culture of subcellular fraction toe te voegen. Veel databestanden maken gebruik van een thesaurus welke hierbij van nut kan zijn.
- Bij het zoeken van informatie is het van belang om uit het enorme aanbod aan data zoveel mogelijk dat deel te vinden dat relevant is voor het onderzoek. Met andere woorden, wat is de precisie en wat de opbrengst

van mijn literatuuronderzoek? Het is gebruikelijk in dit verband een onderscheid te maken tussen *recall* en *precision*:

- Onder *recall* wordt verstaan het percentage van de relevante documenten dat met een bepaalde zoekvraag wordt gevonden.
- *Precision* is het percentage van de gevonden documenten dat werkelijk relevant is.

Onder normale omstandigheden, afhankelijk van het aantal gevonden documenten, is het niet mogelijk om een honderd procent *precision* of *recall* te scoren: hoe groter de *recall* hoe kleiner de *precision*. Door optimalisering van de zoekvraag kan echter wel een zo goed mogelijk evenwicht van een zoekopdracht worden gerealiseerd door:

- te streven naar een optimalisering van de zoektermen zodat ze voor meerdere zoekprogramma's te gebruiken zijn. Bijvoorbeeld, door vastleggen van homoniemen en synoniemen, toepassen van een "wild-character" of van voor-, of natruncatie etc. kunnen zoekcombinaties geschikt worden gemaakt voor meerdere zoeksystemen.
- gebruik te maken van het 'zelflerend vermogen' van een zoekprogramma.

Voorbeeld: Om op basis van een zoekterm alle bestaande webpages te doorzoeken zou te veel tijd kosten. Daarom wordt voorafgaande aan een zoekactie alle op het web aanwezige informatie (alle webpages) geïdentificeerd en verzameld op basis van binnenkomst. Een speciaal software programma een zg. crawler wordt gebruikt om de webpages (incl. links) op te sporen te identificeren, en vervolgens samen te brengen op een enkele locatie.

- De keuze van de te doorzoeken databases dient in belangrijke mate afhankelijk te zijn van de vraag of de gewenste informatie de basis moet zijn voor onderzoek, het onderwijs of het testen van een protocol.

Stel vervolgens een zoekprotocol op. Vermeld daarin de namen van de doorzochte databases, de jaren waarin gezocht wordt, de data waarop gezocht is en de gehanteerde trefwoorden (zie ook tabel 1). Vervolgens kan deze informatie aangevuld worden met de gevonden dierproefalternatieven, gereleerde informatie en suggesties hoe deze resultaten geïntegreerd kunnen worden in een alternatieve dierproefmethode.

*Tabel 1. Een lijst van veel gebruikte trefwoorden: Bron: UCCAA (UC Center for Animal Alternatives): [http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal\\_Alternatives/main.htm](http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/main.htm)*

|   |  |
|---|--|
| alternative#                                | fish or cephalopod#                      |
| analges# or sedative#                       | handling                                 |
| anesthe# or anaesthe#                       | housing or facility design or caging     |
| #animal model#                              | interactive                              |
| animal testing alternatives                 | invertebrate#                            |
| anxiolytic                                  | mathematical model                       |
| artificial#                                 | model#                                   |
| artificial intelligence                     | plastinat#                               |
| systems or AI                               | single-cell# organism#                   |
| assay# or technique# or technic# or method# | software                                 |
| bacteria or protozoa                        | train# or educat# or teach#              |
| behavio# enrichment                         | tranquiliz#                              |
| cadaveric model#                            | video#                                   |
| computer aided instruction or CAI           | virtual and (surg#) or reality           |
| computer simulation                         | vitro and (method or model or technique) |
| culture and (cell or tissue or organ)       | welfare or pain or stress or distress    |
| digital image#                              |  |
| environment# enrichment                     |  |
| euthanasia                                  |  |

## **Conclusie**

Het is in dit korte bestek ondoenlijk een compleet en volledig overzicht te geven van alle zoekmogelijkheden of alle nu bestaande en voor dit onderwerp relevante databestanden te behandelen. Getracht is een representatief overzicht te geven van de voor dit onderwerp meest bruikbare digitale bestanden en hun inhoud. Meer informatie over het zoeken naar relevante literatuur kan worden gevonden op de websites van het Animal Welfare Information Centre (AWIC) en Altweb, zie bijlage.

## **Literatuur**

- Russell W.M.S. & Burch, R.L. (1959) The principles of humane experimental technique, Potters Bar, Herts., UK: UFAW.
- Smith C. P. (1994) AWIC tips for searching alternatives to animal research and testing. Lab Animal March 1994: 46-48. <http://www.nal.usda.gov/awic/alternatives/tips.htm>.

## **BIJLAGE: RELEVANTE DATABESTANDEN**

Hieronder volgt een lijst van databases met een korte beschrijving van de inhoud en categorie(n) waartoe de database behoort. Achter elke database is aangeven tot welke categorie de database behoort: 1 = alternatieven voor onderzoek, 2 = alternatieven voor onderwijs, 3 = alternatieven voor het testen van stoffen.

**Opmerking:** websites verouderen snel. Het is mogelijk dat sommige van onderstaande websites bij de uitgave van dit boek achterhaald zijn. Voor aanvullende of corrigerende informatie wil ik daarom naar de websites van Altweb (<http://altweb.jhsph.edu/databases.htm>) en NCA (<http://www.nca-nl.org/Dutch/Home-NL.htm>) verwijzen.

**Agricola (1, 2):** <http://agricola.nal.usda.gov/>

Agricola is een uitgave van de National Agricultural Library. De database bevat referenties over publicaties en bronnen op het gebied van de landbouw en hiermee samenhangende aspecten.

Agricola bevat specifieke informatie met betrekking tot de dierkunde, diergeneeskunde, plantkunde, entomologie, bosbouw, visserij, landbouw (systemen, oogst, economische aspecten), onderwijs, humane voeding, veterinaire voeding en milieukunde.

**ANZCCART (1):** <http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/>

ANZCCART is een product van het "Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Testing" ANZCCART beschikt niet over een doorzoekbare database maar bevat wel veel nuttige bronnen vooral op het gebied van de grijze literatuur, zoals onderzoeksprotocollen, nieuwsbrieven, en tijdschriftpublicaties welke niet worden genoemd door de algemene literatuurbestanden.

**AltBib (3):** <http://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>

AltBib bevat bibliografische beschrijvingen van alternatieven voor het gebruik van gewervelde dieren in onderzoek- en testprocedures en is een product van de National Library of Medicine.

De bibliografie beschrijvingen hebben tot doel het identificeren van methodes en procedures welke kunnen bijdragen aan de ontwikkeling, testen, toepassing en validatie van alternatieve technieken voor het gebruik van gewervelde dieren in het biomedisch en toxicologisch onderzoek. De AltBib

bibliografie heeft als bron en wordt onderhouden op basis van zoekacties in de MEDLARS databank.

**AltWeb: Pain Management, Humane Endpoints (1)** <http://altweb.jhsph.edu/databases.htm>

De AltWeb database bevat informatie met betrekking tot pijnbestrijding en pijnbeheersing zoals: anesthesie, en analgesie ten behoeve van de meest gebruikte laboratoriumdieren. AltWeb geeft informatie met betrekking tot beschikbare geneesmiddelen en hun bijwerking. Referenties zijn beschikbaar op het gebied van proefdierkundige studies en humaan klinisch onderzoek wat een relatie heeft met proefdieronderzoek. Het Altweb heeft een aantal praktische doelstellingen:

- Ondersteuning van onderzoekers en andere ten behoeve van de uitvoering van alternatieve methoden;
- Altweb wil dienen als een “centraal referentiepunt” voor het verkrijgen van informatie uit: publicaties, databases en andere bronnen op het gebied van alternatieven;
- Ondersteuning in het opzetten en onderhouden van nieuwe alternatieve bronnen welke op geen andere wijze worden ondersteund;
- Promoten van het gebruik van alternatieve bronnen door publicaties op deze site, e-mail, etc.;
- Bevorderen van de dialoog tussen gebruikers van alternatieven.

**ASFA (1, 3):** <http://www.fao.org/fi/asfa/asfa.asp>

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (ASFA) is een internationaal samenwerkend informatie systeem. ASFA bestaat uit een abstract- en een index-service welke de wereldliteratuur afzoekt op onderwerpen van algemeen wetenschappelijke aard en meer specifiek als technologische ontwikkelingen, huisvesting, voeding en conservering van zout-, en zoetwatervissen in relatie tot de bijkomende socio-economische en juridische aspecten. De ASFA bibliografische database is in wezen het resultaat van dit onderzoek en bevat rond een miljoen referenties (sinds 1971). Elke maand worden ongeveer 3500 nieuwe referenties aan het bestand toegevoegd. Elke referentie bevat bibliografische gegevens op basis van titel en brongegevens, met daarnaast een abstract en indien van toepassing de taxonomische en geografische index gegevens.

**AVAR (2):** <http://avar.org/>

Alternatives in Education Database. Deze op het web gebaseerde, direct doorzoekbare databank, bevat informatie over de verschillende alternatieve methoden voor het gebruik van primaten op verschillende niveaus van het onderwijs. De database wordt met grote regelmaat geactualiseerd.

Tijdens een zoekactie wordt een index file doorzocht gebaseerd op indexering van de metatags en titeltags van elk document in de AltEd directory. Beschikbaar zijn ook gealfabetiseerde trefwoordlijsten.

**AWI Comfortable Qtrs (3):** [http://www.awionline.org/lab\\_animals/](http://www.awionline.org/lab_animals/)

AWI geeft toegang tot meerdere onderwerpgerichte databases. De databases bevatten de volgende onderwerpen: kooiverrijking, verfijning gebaseerd op de 3 V's, en aanbevelingen voor soort specifieke huisvesting en omgang met de dieren.

**AWIC (1):** <http://www.nal.usda.gov/awic/>

Het Animal Welfare Information Center (AWIC) is het informatiecentrum van het United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS) en de National Agricultural Library (NAL). AWIC geeft informatie over onderwerpen zoals: huisvesting, gedrag, verzorging, voeding, fok, alternatieven, pijnbestrijding en pijnbeheersing (anesthesie en analgesie), experimentele technieken, ethiek en juridische aspecten.

**BIOSIS (1):** <http://www.biosis.org/>

BIOSIS voorziet in de internationale informatie behoefte op het gebied van landbouw, biochemie, biomedisch onderzoek, biotechnologie, botanie, ecologie, milieu, genetica, microbiologie, diergeneeskunde en farmacologie. In totaal worden rond de 6000 tijdschriften, seriële publicaties en conferentieverlagen geïndexeerd, wat resulteert in meer dan 600.000 referenties op jaarbasis.

**CAB (2):** <http://www.cabi.org/>

Citaties en abstracts op het gebied van de landbouw. De databases bevatten tevens literatuur -referenties met betrekking tot de diergeneeskunde, humane voeding en diervoeding, stedelijke ontwikkeling, toerisme en humane ecologie. Op het gebied van de proefdierkunde en het gebruik van alternatieven zijn eveneens veel referenties aanwezig.



**CCAC (1):** <http://www.ccac.ca/>

CCAC is een nationaal georiënteerde organisatie welke verantwoordelijk is voor het instellen en handhaven van standaarden met betrekking tot het houden en het gebruik van dieren in onderzoek en onderwijs en bij het testen van stoffen in Canada. CCAC beschikt niet over een eigen database maar is wel een bron van informatie op bovengenoemde onderwerpen.

**CRIS (1):** <http://cris.csrees.usda.gov/>

Current Research Information System (CRIS) is het informatie- en documentatiecentrum van het United States Department of Agriculture (USDA). Het documentatiecentrum verzamelt, en stelt informatie beschikbaar over lopend en recent afgerond onderzoek- en onderwijsprojecten op het gebied van landbouw, voedselproductie, humane voeding, diervoeding en bosbouw. Op het gebied van de proefdierkunde is veel informatie beschikbaar met betrekking tot zoötechnische aspecten.

**CRISP (1):** <http://crisp.cit.nih.gov/>

CRISP staat voor Computer Retrieval of Information on Scientific Projects en is een op trefwoorden doorzoekbare database. CRISP bevat informatie met betrekking tot door de Amerikaanse overheid gesubsidieerd biomedisch onderzoek door universiteiten, ziekenhuizen en andere onderzoekscentra.

**SIS ECVAM (3):** <http://ecvam-sis.jrc.it/>

SIS ECVAM is het toonaangevende internationale centrum voor de coördinatie en validatie van alternatieve technieken, het centrum voorziet in informatie met betrekking tot de theoretische en praktische aspecten van validatie van nieuwe testmethodes, de actuele stand van zaken met betrekking tot de validatie van alternatieve technieken voor het toxicologisch onderzoek en de biowetenschappen in het algemeen. Validatie van alternatieve technieken vindt plaats op onderzoeksgebieden als embryonale toxiciteit, hematotoxiciteit, metabolisme geïnduceerde toxiciteit, toxiciteit van metalen, neurotoxiciteit, nephrotoxiciteit en het algemeen dierenwelzijn (wetenschappelijk en ethisch) zoals bijvoorbeeld het gebruik van transgene dieren.

## **ECOTOX DATABASE**

**EcoTox (3):** <http://www.epa.gov/ecotox/>

De ECOTOX (ECOTOX-icology) database biedt informatie met betrekking tot de impact van chemicaliën op het milieu.

**ERIC (2):** <http://www.eric.ed.gov/>

Het Information Resources Information Center (ERIC) beschikt over de meest uitgebreide onderwijsdatabase in de wereld. De database bevat bibliografische informatie uit tijdschriften, boeken, nieuwsbrieven, audiovisuele producties, computersoftware, rapporten, etc. op het gebied van onderwijs en onderwijs gerelateerde onderwerpen. In ERIC is veel informatie voorhanden over het gebruik van dieren in het middelbaar- en hoger onderwijs.

**EURCA (2):** <http://www.eurca.org/>

De EURCA is een uitgebreid databestand op het gebied van alternatieven. Informatie wordt gegeven over de pedagogische kwaliteit van alternatieve modellen op basis van onafhankelijke bewijsvoering.

De bruikbaarheid van alternatieve modellen wordt getoetst aan een aantal criteria zoals het voldoen aan het 3 V's concept, de implementatiemogelijkheden in het hoger onderwijs, het interactieve karakter van het model, de mogelijkheden om het model te evalueren en aanbevelingen door deskundigen op basis van kritische analyses.

**FEDRIP (1):** <http://grc.ntis.gov/fedrip.htm>

De Federal Research in Progress Database (FEDRIP) bevat informatie over door de Amerikaanse overheid gesubsidieerd lopend onderzoek op het gebied van natuurwetenschappen, technologie en bio-wetenschappen. Het unieke van deze database is gelegen in de niet bibliografische opzet van de database. De database bevat project beschrijvingen op basis van projecttitel, trefwoorden, begindatum, geschatte duur, projectleider, samenvatting en voortgang.

**ICCVAM (3):** <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

Het Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ontwikkelt en valideert nieuwe alternatieve technieken, het stelt criteria en processen voor de validatie en acceptatie van toxicologische testmethodes ten behoeve van risico analyse van toxiciteitstesten.

**ILAR Animal Models and Strains (1):** [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarhome/models.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/models.shtml)

ILAR heeft een unieke zoekmachine ontwikkeld welke alleen de websites van die proefdieren en bronnen indexeert en doorzoekt welke als link worden aangeboden. De zoekmachine geeft alleen de zoekresultaten van sites welke het gezochte diermodel of stam verkopen of distribueren.

**INVITTOX (3):** <http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/>

Databank over in-vitro technieken in de toxicologie. Het doel van Invittox is primair informatie te verschaffen over, en actualiseren van technische informatie met betrekking tot de uitvoering van in ontwikkeling zijnde of recent ontwikkelde in-vitro technieken hun toepassing en de voor-, en nadelen. De informatie wordt verkregen van die onderzoekers welke soortgelijke technieken gebruiken. Elk protocol bevat een gedetailleerde beschrijving op basis waarvan de techniek door een andere onderzoeker gereproduceerd kan worden, tevens bevat elk protocol onderzoeksgegevens en indien bekend argumenten voor het gebruik. De protocollen bevatten tevens kritische commentaren voor wat betreft de nauwkeurigheid van het systeem, de gevoeligheid, gebruiksvriendelijkheid, tekortkomingen, etc.

#### *Alternatives to Skin Irritation & Corrosion Testing in Animals*

**Invitroderm (3):** <http://www.invitroderm.com/>

Deze database bevat alternatieven voor onderzoek op het gebied van oog- en huidirritatietesten op dieren. Er zijn in deze database doorzoekbare bibliografieën inclusief abstracts te vinden.

**JAX Resources, Informatics (1):** <http://www.jax.org/resources/index.html>

De JAX Resources database, een initiatief van The Jackson Laboratory, ondersteund en geeft toegang tot een veelheid aan informatie bronnen: Mice Database, Mouse Genome Informatics, International Mouse Strains Resources, Mouse Resources, and Informational Resources.

**NCI Mouse Models (1):** <http://mouse.ncifcrf.gov/>

Het NCI Mouse Models of Human Cancers Consortium (MMHCC) is een samenwerkingsproject ontwikkeld om muismodellen te karakteriseren, voorraden (stammen) op te bouwen, informatie te verzamelen en verstrekt een innovatieve benadering voor de toepassing van muismodellen in het kankeronderzoek. Naast deze 'eigen' activiteiten sponsort het NCI een groot

aantal andere projecten met het doel om muismodellen te ontwikkelen, te analyseren en toepassingen te vinden ten behoeve van het kankeronderzoek.

**NIH Model Organisms (1):** [http://grants.nih.gov/grants/policy/model\\_organism/index.htm](http://grants.nih.gov/grants/policy/model_organism/index.htm)

Deze website geeft informatie op het gebied van nationale (VS) en internationale activiteiten en belangrijke bronnen die worden ontwikkeld ter ondersteuning van het biomedisch onderzoek dat gebruik maakt van de in deze database genoteerde muismodellen.

**Norina (2):** <http://oslovet.veths.no/norina>

Norina is een initiatief van het Norwegian Inventory of Alternatives en Norwegian Centre for Laboratory Animal Science and Alternatives. Norina bestaat uit een database met informatie over audiovisuele hulpmiddelen, software, interactieve videoprogramma's, cd-roms, en andere alternatieven.

**PrimateLit (1):** <http://primatelit.library.wisc.edu/>

De PrimateLit database geeft bibliografische toegang tot wetenschappelijke literatuur over het gebruik van primaten in onderzoek en onderwijs. De records bevatten alle publicatiecategorieën: tijdschriftpublicaties, boeken, korte samenvattingen, technische rapporten, proefschriften, en hoofdstukken uit boeken. Daarnaast verschillende onderwerpgebieden zoals gedrag, groepshuisvesting, ecologie, voortplanting, veldstudies, diermodellen, diergeneeskunde, psychologie, farmacologie, evolutie, taxonomie, ontwikkelings- en moleculaire biologie, genetica en zoogeografie. De analyse van literatuurcollectievorming en indexering is uitgevoerd door het Primate Information Center, Washington National Primate Research Center, Univ. of Washington, USA.

**PsycInfo (1):** <http://www.apa.org/psycinfo/>

PsycInfo is een onderdeel van de American Psychological Association (APA). De database bevat referenties op publicaties uit professionele tijdschriften, conferentieverlagen, boeken, rapporten, proefschriften en tevens relevante Internet sites op het gebied van de psychologie en aanverwante disciplines, meestal inclusief abstract. De inhoud bestaat uit informatie over alternatieven voor het testen van pharmaca.

**PubMed (1):** <http://www.pubmedcentral.nih.gov/>

Referenties en abstracts van tijdschriftpublicaties op het gebied van de geneeskunde, bio-wetenschappen, gezondheidszorg, diergeneeskunde, moleculaire biologie en genetica. PubMed is een dienst van de U.S. National Library of Medicine.

**RTECS (3):** <http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/default.html>

Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) voorziet in informatie over toxiciteit over 140.000 chemische substansies. De database bevat toxicologische informatie en overzichtsartikelen, internationale richtlijnen over de blootstelling aan chemische stoffen, verwijzingen naar de in de VS geldende standaarden en richtlijnen, analysemethodes en lijsten van gevaarlijke stoffen.

**TEXTBASE (1):** [http://oslovet.veths.no/fag.aspx?fag=58&mnu=databases\\_2](http://oslovet.veths.no/fag.aspx?fag=58&mnu=databases_2)

Textbase bevat informatie m.b.t. recente boekuitgaven op het gebied van de proefdierkunde.

De indeling van de records is als volgt: boektitel, auteurs, korte omschrijving van de inhoud, eventueel een commentaar, jaar van uitgave en uitgever (incl. URL verwijzing).

**ToxNet (3):** <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

Toxnet is een initiatief van De National Library of Medicine Specialized Information Services en clustert databanken op het gebied van de toxicologie, schadelijke chemicaliën, milieu en gezondheid.

Het cluster bestaat nu uit de Hazardous Substances Data Bank (HSDB), Integrated Risk Information System (IRIS), Chemical Carcinogenesis Research Information System (CCRIS), Developmental and Reproductive Toxicology en Environmental Teratology Information Center (DART/ETIC), Toxics Release Inventory (TRI), International Toxicity Estimates for Risk (ITER). Andere databases op dit gebied zullen in de toekomst worden toegevoegd.

**WildPro Info Network (1):** <http://www.wildlifeinformation.org/>

Wildlife Information Network geeft informatie over de gezondheid en het beheer van wilde dieren en hun woonomgeving. De database bevat een elektronische encyclopedie en een bibliotheek van elektronische boeken en docu-

menten welke informatie geven over de geschiedenis, gezondheid en beheer van in gevangenschap-, en in het wild levende dieren.

**ZEBET (3): <http://www.bfr.bund.de/cd/1433>**

ZEBET is in Duitsland verantwoordelijk voor de documentatie en informatie over alternatieven voor dierproeven in onderzoek en testen. De ZEBET database AnimAlt is voornamelijk ontworpen ter ondersteuning van het onderzoek naar de imperatieve aard van het dierexperimenteel onderzoek door het aangeven van informatie m.b.t. een mogelijk alternatief. Om hier aan te kunnen voldoen biedt ZEBET gevalideerde informatie over alternatieve technieken. Sinds februari 2000 is de ZEBET database gratis beschikbaar via het Internet. De database bevat beschrijvingen van specifieke methodes en evaluaties van die methodes op basis van de 3 V's. Daarnaast bevat het een beschrijving van de opzet van een experiment (duplicatie) dat op deze manier kan worden gewijzigd, de namen van onderzoekers die ervaring hebben met dit alternatief en relevante literatuurreferenties over deze alternatieven.

# De lange weg naar de begrenzing van dierproeven

Waarom de wetenschap bepaalt en de dierenbescherming baalt zolang de politiek draalt

*Bob van den Bos*

In Nederland is de wettelijke bescherming van dieren bij experimenten pas laat tot stand gekomen. Toen staatssecretaris Kruisinga in 1970 zijn ontwerp Wet op de dierproeven indiende, hadden alle ons omringende landen al wettelijke grenzen gesteld aan dierexperimenteel onderzoek. Daar was een lange geschiedenis van afstel en uitstel aan voorafgegaan. De Wet op de dierproeven (Wod) die uiteindelijk in 1977 tot stand kwam, bepaalt in essentie dat dierproeven alleen zijn toegestaan als de noodzaak ervan is aangetoond en er geen erkende alternatieven bestaan. Vanaf dat moment kwam in Nederland het (stimuleren van) onderzoek, gericht op vervanging, vermindering en verfijning, langzaam van de grond. Het duurde echter tot de jaren tachtig alvorens alternatieven op politiek niveau belangrijk genoeg gevonden werden om er een budget voor vrij te maken. Waarom heeft dit allemaal zo lang geduurd?

## **De voorgeschiedenis van de Wod**

Een terugblik in het verleden leert dat een wettelijke regeling van dierexperimenten een eeuw op zich heeft laten wachten.<sup>1</sup> Al in 1880 is bij de behandeling van het Wetboek van Strafrecht in de Tweede Kamer gepleit voor wetsartikelen om nodeloze proeven en martelingen tegen te gaan. In de wet stond weliswaar een verbod op mishandeling van dieren (als deze tegen de goede zeden inging), maar dit gold niet voor experimenten die een wetenschappelijk doel dienden en waar meer of minder lijden voor dieren geen opzet maar een onvermijdelijke consequentie was.

De toenmalige minister van Binnenlandse Zaken (Volksgezondheid bestond nog niet) vroeg de Koninklijke Academie van Wetenschappen (KNAW) om advies. Volgens de Academie was er geen sprake van misbruik en kon vivisectie, zoals dierproeven toen werden genoemd, niet gemist worden op de uni-

1 Een aantal historische feiten uit dit overzicht is ontleend aan de Memorie van Toelichting bij de Wet op de dierproeven, Zitting 1969-1970 – 10589. Ook is informatie geput uit het archief van Proefdier Vrij. De schrijver is de organisatie erkentelijk voor haar medewerking.

versiteiten. Ook de geneeskundige faculteiten hadden geen behoefte aan een wettelijke regeling. Het viel volgens de onderzoekers niet van te voren vast te stellen of een proef nuttig of noodzakelijk was, omdat ogenschijnlijk overbodige experimenten soms onverwacht belangrijke resultaten opleverden. Bovendien zou in Duitsland en Engeland al gebleken zijn dat regels in de praktijk niet goed werkten. Minister en parlement legden zich bij dit antwoord neer.

Een aantal jaren later (1899) begon de Tweede Kamer er echter weer over. Parlementsleden vroegen zich af hoe het er eigenlijk aan toeging bij de dierexperimenten en of deze niet beperkt konden worden. De regering antwoordde dat proeven werden gehouden op alle universiteiten voor algemeen wetenschappelijk onderzoek om de werking van geneesmiddelen na te gaan, de oorzaken van ziektes te herkennen, nieuwe operatiemethoden te beproeven en om demonstraties te geven aan studenten. Er werden volgens de regering ook voldoende voorzorgsmaatregelen genomen om mishandeling te voorkomen. Het antwoord was blijkbaar afdoende voor het parlement want een wettelijke regeling mocht achterwege blijven.

Toch kwam de Kamer er steeds weer op terug. In 1907 leidde dit tot de instelling van een Staatscommissie. Deze achtte een wettelijke regeling noodzakelijk. Er zou een vergunningstelsel moeten komen en voorschriften voor een goede behandeling van de dieren. Wederom kwam er sterk verzet vanuit de universitaire wereld. Onderzoekers ervoeren het rapport van de Staatscommissie als ongefundeerde kritiek op hun handelwijze. Zij benadrukten nogmaals het grote belang van vivisectie voor de wetenschap. En, wat betreft de bestaande wetten in Duitsland en Engeland, deze zouden het onderzoek daar in de weg staan. De adviezen van de Staatscommissie werden niet opgevolgd.

In 1928 volgde er weer een herhaling van zetten. De Kamer vroeg de regering naar haar standpunt over dierproeven en kreeg als antwoord dat wetgeving niet nodig geacht werd. De minister van Onderwijs had (wederom) laten onderzoeken wat de omvang van de vivisectie in Nederland was en of er redenen waren om de praktijk te reglementeren. Ook nu weer werd er geconcludeerd dat er geen misstanden bestonden en wetgeving dus niet nodig was. Vijf jaar later brachten aanhoudende klachten over experimenten de minister van Binnenlandse Zaken er echter wel toe om maatregelen te overwegen. De Gezondheidsraad bepleitte een vergunningstelsel, maar de minister vond het uiteindelijk politiek toch niet opportuun het advies te volgen. Ook de bezettingsmacht in de Tweede Wereldoorlog heeft nog overwogen om wettelijke maatregelen naar eigen Duits voorbeeld in te voeren, maar is niet tot daden overgegaan.



In 1949 werd wederom, nu door de minister van Sociale Zaken (SZ), een onderzoek ingesteld naar de omvang waarin en de wijze waarop dierproeven werden verricht. De Gezondheidsraad vond een wettelijke regeling merkwaardigerwijs nu niet meer nodig. De minister wilde echter toch een vergunningstelsel invoeren, maar zag hier vervolgens weer vanaf. In 1961 herhaalde de minister in de Tweede Kamer de toezegging om de praktijk nader te onderzoeken, zowel in ons land zelf als over de grens. Een interdepartementale werkgroep concludeerde in 1966 dat er een wet zou moeten komen, die het verrichten van dierexperimenten verbiedt, tenzij de onderzoeksinstelling daartoe een vergunning heeft. In 1970 wordt eindelijk een ontwerp van de Wet op de Dierproeven (Wod) ingediend bij de Tweede Kamer. Deze werd in 1977 in het Staatsblad gepubliceerd.

### **Een kenschets van de Wod**

De dierenbeschermers die al zo lang op wetgeving hadden aangedrongen was het aanvankelijk vooral te doen om een verbod op het betrekken van honden en katten uit de huiselijke omgeving of particuliere handel voor laboratoriumdoeleinden. Aan deze wens werd voldaan. Ook zijn in de wet voorschriften opgenomen over verdoving, narcose of doden van dieren om het lijden te beperken. Uit de inhoud blijkt echter ook een substantiële invloed van de wetenschap.

Zo zijn in de regelingen de sporen van het verzet tegen de inbreuk op de autonomie van de wetenschappers duidelijk terug te vinden. De Wod is gebaseerd op een hoge mate van zelfregulering. De overheid moest op een flinke afstand blijven. Het toezicht werd opgedragen aan de dierenartsen van de veterinaire hoofdinspectie van het Ministerie van Volksgezondheid. De wet verplichtte vergunninghouders een administratie van de proeven bij te houden en daar periodiek over te rapporteren. Volgens de Memorie van Toelichting bij het wetsontwerp echter lag het “niet in de bedoeling dat deze administratie en rapportage zeer uitgebreid zullen zijn. Het lijkt voldoende indien de inspecteur daaruit gewaar kan worden wat er in een laboratorium omgaat en het de overheid in grote lijnen bekend is wat de stand van zaken in het land met betrekking tot proeven op dieren is”.<sup>2</sup>

2 MvT, 1969-1970-10589, p. 8. Opmerkelijk is ook dat in de Wod (niet in de ontwerptekst) in artikel 1 de door onderzoekers gebruikte eufemistische term “ongerief” bij dieren terecht is gekomen, waarmee ook de meest ernstige vorm van lijden of letsel wordt bedoeld. De term in de wet betreft (artikel 1, lid ): het berokkenen van pijn, lijden, ongemak of blijvend letsel. Van Dale's Groot -woordenboek der Nederlandse Taal verstaat onder “ongerief “ echter uitsluitend: hinder, last of ongemak.

De sector wilde en kreeg een eigen rechtsregime dat zich grotendeels aan de openbaarheid en de rechtelijke toetsing onttrekt. Deze opzet is aardig geslaagd. In zijn beschouwing 'Wet op de dierproeven op de proef gesteld' stelt prof. Boon dat in de praktijk "de juridische toelaatbaarheid van (aspecten van) het gebruik van dierproeven nimmer langs de geëigende wegen van rechtsbescherming – noch bestuursrechtelijk noch strafrechtelijk – is getoetst ... Daar is een goede verklaring voor te geven: het laboratorium in het algemeen is een plek die slechts betreden wordt door dierproefdeskundigen en niet door opsporingsambtenaren" (Boon, 1999).

### **Verdere ontwikkelingen van de Wod**

In 1995 en 1996 hebben de Tweede en Eerste Kamer een ingrijpende wijziging op de Wod goedgekeurd. Aanpassing van de wet was nodig vanwege de implementatie van de EG-richtlijn en de Overeenkomst van de Raad van Europa. Tegelijkertijd konden zo wensen uit de praktijk of de politiek wettelijk worden verankerd. Voorafgaand aan en tijdens de parlementaire behandeling hebben vertegenwoordigers van zowel de wetenschap als de dierenbescherming getracht hun stempel op de wetgeving te drukken. Het uiteindelijk politieke resultaat is hier in hoge mate een afspiegeling van. In verscheidene stadia van het wetgevingsproces hebben zij de volksvertegenwoordigers voorzien van gedetailleerd schriftelijk en mondeling commentaar op regerings- en kamerstukken.

Zo werden tijdens de parlementaire behandeling de fractiewoordvoerders, waaronder schrijver dezes, benaderd door organisaties die hun opvattingen graag in de wet terug wilden zien. Er was een samenwerkingsverband gevormd tussen de Nederlandse Vereniging tot Bescherming van Dieren en de Nederlandse Bond tot Bestrijding van Vivisectie. Deze laatste is in 1995 omgevormd tot Proefdiervrij. De organisaties betoonden zich "zeer teleurgesteld" over het wetsvoorstel, omdat dit onvoldoende zou bijdragen aan de terugdringing van dierproeven.<sup>3</sup> De dierenbeschermingsorganisaties hebben echter in mijn waarneming zeker invloed uit kunnen oefenen, vooral doordat zij de wet niet principieel afwezen, althans voor de 'time being', maar met voorstellen voor verandering kwamen. Zo waren zij bijvoorbeeld groot voorstander van het

3 Zie: Memorandum voor Proefdieren, nota naar aanleiding van de wijziging van de wet op de dierproeven, uitgebracht door de Nederlandse Vereniging tot bescherming van dieren en de Nederlandse Bond tot Bestrijding van de Vivisectie, Den Haag, 1992. Dit rapport refereert aan een uitspraak van prof. L.F.M. van Zutphen, hoogleraar proefdierkunde in Utrecht, dat het proefdiergebruik met 50 à 60 % omlaag zou kunnen (Elsevier, 25/11/1989).

onderbrengen van het begrip ‘intrinsieke waarde van het dier’ in de wet en de verplichting een alternatievendeskundige in de DEC’s te benoemen.

Ook de onderzoekswereld lobbyde. Vooral op haar aandringen was er in het wetsontwerp een regeling voor Dier Experimenten Commissies (DEC’s) opgenomen, waar de Tweede Kamer (geamendeerd) mee instemde. DEC’s waren niet echt nieuw. De Nederlandse Vereniging van Proefdierkunde had hier al in 1982 voor gepleit. Deze DEC’s moesten vergunninghouders en onderzoekers adviseren over alle aspecten van dierproeven, waaronder toelaatbaarheid, opzet en uitvoering. Evenzo liet de Nederlandse Vereniging Vergunninghouders Dierproeven in 1986 weten dat in 90 % van de instellingen op dat moment al DEC’s functioneerden, zij het op zeer uiteenlopende wijze. In datzelfde jaar publiceerde de Proefdierkundige Federatie een voorstel van wet voor dit onderwerp.

De uiteenlopende beïnvloedingspogingen ten spijt bestonden er geen grote meningsverschillen in de Tweede Kamer. Er is uitstekend samengewerkt tussen CDA, PvdA, D66, Groen Links, RPF en in iets mindere mate de VVD. Vanuit de Kamer is het wetsontwerp op aandringen van dierenbeschermers en tegen de wens van veel onderzoekers op enkele belangrijke punten bijgesteld. Bij de formulering is overigens wel rekening gehouden met bezwaren van wetenschappelijke zijde.<sup>4</sup> Ik kon gemakkelijk brede steun verwerven voor mijn drie amendementen: het in de wet onderbrengen van de intrinsieke waarde van het dier als algemeen uitgangspunt (de VVD was tegen), de bepaling dat de DEC-voorzitter niet in een arbeidsverhouding mocht staan tot de vergunninghouder en de eis dat een ‘alternatievendeskundige’ deel moest uitmaken van de DEC. Ook voor amendementen op het gebied van cosmetica, LD 50/LC 50, in het wild gevangen dieren en ongewervelde dieren werden zonder veel problemen ruime kamermeerderheden gesmeed.

### **De opkomst van alternatieven**

De sterk gegroeide weerstand tegen dierproeven in veel landen leidde in de jaren zeventig tot internationale en nationale regelgeving. Hieraan lag onder meer de herontdekking van het boek “The Principles of Human Experimental Techniques” ten grondslag (Russel & Burch, 1959). De schrijvers

4 Zo is bijvoorbeeld aan het amendement dat in het wild gevangen dieren van onderzoek uitsluit toegevoegd: met uitzondering van dieren van bij ministeriële regeling aangewezen soorten. Aan het amendement dat proeven met LD50/LC50 testmethoden verbiedt, is toegevoegd dat vrijstelling kan worden verleend als er geen alternatief is voor de bedoelde methode.

ontvouwden hierin het concept van de drie V's. Er moesten methoden worden ontwikkeld die tot Vervanging, en indien dat onmogelijk was tot Vermindering van het aantal dieren zouden leiden. Ook moesten de praktijken en procedures zo Verfijnd worden dat dieren minimaal zouden hoeven lijden. Behalve ethische motieven werden voor alternatieve methoden ook wetenschappelijke argumenten (nieuwe perspectieven) en economische (goedkoper) redenen aangevoerd.

In 1986 is door Raad van Europa een verdrag en door de EG een Richtlijn opgesteld ter bescherming van dieren bij experimenten (zie boven). Hierin kregen ook de alternatieven een plaats. In Nederland was het staatssecretaris Van der Reijden van het toenmalige Ministerie van Welzijn Volksgezondheid en Cultuur (WVC), die begin jaren tachtig als eerste subsidies verstrekke voor 'alternatief onderzoek'. Zijn opvolger, Dees, stelde in 1987 het Platform Alternatieven voor Dierproeven (PAD) in. Dit kreeg de taak ministers te adviseren over subsidieverlening op dit gebied. Ook moest het Platform onderzoek stimuleren, inventariseren en coördineren. Behalve de overheid waren ook dierenbelangenorganisaties en het bedrijfsleven vertegenwoordigd in dit overlegorgaan (zie ook de bijdrage van Arendzen).

Vanaf 1998 is de coördinatie van het alternatievenonderzoek in handen gekomen van ZonMW. Het PAD kreeg een adviesfunctie. Een Programmacommissie Alternatieven voor Dierproeven werd belast met het uitschrijven van subsidieronden en de selectie van onderzoeksvoorstellen. Hierin zitten prominente onderzoekers en vertegenwoordigers van bedrijfsleven en dierenbescherming. De commissie wordt bijgestaan door het Nederlands Centrum voor Alternatieven (NCA), dat adviseert, inventariseert, participeert in de controle op lopende projecten en zorg draagt voor kennisoverdracht. Het NCA is ondergebracht bij de Universiteit van Utrecht (Diergeneeskunde). In 2000 ging het programma '*Dierproeven Begrensd*' van start.

Hoewel het om relatief bescheiden bedragen ging (enkele miljoenen gulden per jaar) is de onzekerheid over de continuïteit van de subsidiëring steeds blijven bestaan. Argumenten voor deze terughoudendheid waren de beperkte resultaten en de lange duur tussen ontwikkeling van alternatieve testen en hun implementatie. Dit leidde tot veel gesteggel over de budgettering. Zo had staatssecretaris Terpstra (kabinet Kok I, (1994-1998) het budget voor alternatieven-ontwikkeling met 1 miljoen verhoogd, maar wilde minister Borst deze verhoging vervolgens weer ongedaan maken. Onder druk van de Tweede Kamer (amendement Rouvoet) zag zij hiervan af en deed er nog een half miljoen per jaar bovenop. Voor de periode 2005-2008

had minister Hoogervorst eerst 300.000 euro beschikbaar, maar na de “positieve evaluatie” van het Programma kwam hij (in mei 2005) tot vreugde van de Kamer met twee ton per jaar extra op de proppen.

### **Conclusie**

Er is (vrijwel) geen onderwerp in de parlementaire geschiedenis waarbij wetgeving zo lang is uitgesteld. Steeds weer zagen we hetzelfde patroon: parlementsleden uiten hun ongerustheid, de verantwoordelijke bewindsman wimpelt deze niet weg maar laat de noodzaak van regelgeving nagaan. De ‘anti-vivisectie’ pleit voor wetgeving, maar de onderzoekswereld verzet zich daar hevig tegen met als argumenten dat het niet nodig is, de voortgang van wetenschap belemmert en ervaringen in buitenland aantonen dat het niet werkt. De regering besluit tenslotte het onderwerp te laten rusten.

Steeds weer mochten de wetenschappelijk betrokkenen (medici, farmaceuten, onderzoekers) een belangrijke rol spelen in het onderzoek naar hun eigen praktijk. Laboratoria bleven voor buitenstaanders een afgeschermd gebied. Zo kon gemakkelijk een beeld ontstaan dat er geen gegronde klachten waren, dat er zorgvuldig met de dieren werd omgegaan, dat deze goed werden verzorgd en niet werden gebruikt als er geen strikte noodzaak bestond. Het tegendeel was moeilijk aan te tonen. De anti-vivisectiebeweging probeerde dit laatste wel, maar was pas na tientallen jaren in staat om voldoende maatschappelijke en politieke steun te verwerven die leidde tot wetgeving. Een belangrijke reden hiervoor was de langdurige compromisseloze opstelling van de dierenbeschermingsorganisaties: proeven met dieren moesten hoe dan ook verboden worden, wat de gevolgen voor onze gezondheid (en van dieren) ook mochten zijn. Zij streefden dus vooral totale vervanging na. Daardoor lieten zij veel beïnvloedingsruimte over aan de wetenschap. Werkelijke invloed op de politieke besluitvormers kregen de dierenbeschermers pas toen zij hun doel – het totaalverbod op dierproeven – verschoven naar de lange termijn en constructief gingen meedenken over verbeteringen van de actuele situatie. Pas in de jaren zeventig drong onder druk van maatschappelijke onvrede het besef door dat de wetenschap wel degelijk zou kunnen en dus moeten streven naar alle drie de V’s: *vervanging*, *vermindering* en *verfijning* van dierproeven.

Volgens de schrijvers van ‘Noodzakelijk Kwaad’, Evaluatie Wet op de Dierproeven is het echter vooral aan de onverzettelijkheid van de volksvertegenwoordiging te danken dat de wet er uiteindelijk gekomen is: “ Uit de geschiedenis wordt duidelijk dat de werkzaamheden van het parlement niet

altijd, zoals sommigen lijken te denken, worden gedictéerd door de waan van de dag. Door een volle eeuw lang van taai vol te houden en aan te dringen heeft zij in dit geval wetgeving afgedwongen” (Freriks e.a., 2005).<sup>5</sup>

Van een glansrol van de volksvertegenwoordiging is evenwel geen sprake. Integendeel, we moeten vaststellen dat de Tweede Kamer zich telkens weer heeft neergelegd bij de passiviteit van de regering. De parlementariërs lieten zich keer op keer met een kluitje in het riet sturen. Blijkbaar vond (de meerderheid in) de Kamer het onderwerp steeds niet belangrijk of urgent genoeg om het kabinet onder sterke politieke druk te zetten of om zelf een initiatief tot wetgeving te nemen. Ook de politieke partijen vonden het onderwerp te heikel en hebben er nooit een ‘issue’ van gemaakt, voor noch na verkiezingen. Behalve de omslag bij critici van dierproeven werd de kentering in de politiek van afzijdigheid naar actieve wetgeving ook ingegeven doordat we niet langer konden achterblijven bij de buurlanden.

De dierproefregelgeving is bovendien een zeer technische aangelegenheid. Voor niet-deskundigen en dus ook voor politici, was en bleef het moeilijk om een afweging te maken tussen het belang van de dieren en de wetenschappelijke noodzaak. Geen zinnig mens houdt van toebrengen van letsel aan dieren. Tegelijkertijd hecht iedereen sterk aan zijn gezondheid. Niemand ontkent het belang van goede medicijnen, sera of vaccins en niemand wil ziek worden door voedsel of door gebruiksmaterialen. Mede hierom is er altijd een strikte scheiding aangebracht tussen algemene dierenbeschermingsmaatregelen en regels voor dierproeven.

Regering en parlement hebben twee keer (bij de totstandkoming van de Wod in 1977 en bij de herziening van de wet in 1996) een wettekst vastgesteld die aansloot bij de praktijk (zoals de wettelijke verankering van de reeds bestaande praktijk van DEC’s in 1996) dan wel het redelijke midden zocht tussen de opvattingen van voor- en tegenstanders. Zo heeft de wetenschap een hoge mate van zelfbestuur, zelfregulering en juridische afscherming gekregen en zij wil daar ook niet meer vanaf. Ook van de dierenbescherming is een aantal, zij het lang niet alle, wensen in de wet terecht gekomen. Daarnaast tracht de wetenschap aan bezwaren tegen dierproeven tegemoet te komen door de ontwikkeling van *in vitro* methoden. Het gegroeide besef van het belang van alternatieven heeft van overheidswege een beleidsmatige vertaling gekregen in een bescheiden subsidiëring voor alternatievenonderzoek. De financiering hiervan staat echter telkens weer ter discussie.

5 De taalfouten zijn ongecorrigeerd overgenomen – BvdB

De maatschappelijke druk op de overheid is kennelijk steeds onvoldoende om de regering blijvend te overtuigen. Ook wordt het tijd dat de academische wereld zich als geheel achter de alternatieven gaat scharen. Zolang de wetenschappers dralen zullen de politici falen en blijven de dierenbeschermers balen.

### **Literatuur**

Boon D. (1999) Wet op de dierproeven op de proef gesteld. *Biotechniek*, 38 (2): 22-23.

Freriks A.A., Meulen B.M.J., Belt H. Van der van den, Holt H ten, Verstappen J. (2005) Noodzakelijk kwaad, evaluatie van de Wet op de dierproeven. Den Haag: ZonMw.

Russell W.M.S. & Burch R.L. (1959) *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen.

# De overheid en alternatieven voor dierproeven: een duivels dilemma

*Iris Arendzen*

Bij veel dierproeven zullen dieren in hun welzijn worden aangetast zonder dat dit profijtelijk is voor het dier zelf. Dit betekent veelal dat er handelingen aan dieren worden verricht die onder de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren (Gwwd) niet zouden mogen worden uitgevoerd. Er moet dus ten eerste een heel goede reden zijn om de dieren aan deze handelingen bloot te stellen en ten tweede moet er vooraf, tijdens en na een proef continu worden bekeken of er de grootst mogelijke zorgvuldigheid is betracht. De overheid bevindt zich daarmee in een dilemmavolle positie: enerzijds is het voor de bescherming van milieu en volksgezondheid, en de ontwikkeling van de wetenschap nodig om onderzoek te doen waarbij soms proefdieren worden gebruikt. De maatschappij verwacht dit ook van de overheid. Producten die op de markt komen moeten veilig zijn, voor ziekten moeten therapieën en (betere) medicijnen worden ontwikkeld die hun merites daadwerkelijk hebben bewezen. De overheid stelt dan ook allerlei (dier)testen verplicht. Anderzijds heeft de overheid ook een rol in de bewaking van het welzijn van dieren. In dit spanningsveld is de overheid voortdurend op zoek naar een punt van consensus. Waar dit punt op een bepaald moment ligt, is afhankelijk van de grootte van de diverse krachten die hierop hun invloed uitoefenen.

## **Wet- en regelgeving & alternatieven**

Toen in 1977 de Wet op de dierproeven (Wod)<sup>1</sup> werd gepubliceerd was het boek van de heren Russell en Burch *The principles of humane experimental technique* waarin het principe van de 3 R's (*Replacement, Reduction, Refinement*) uiteengezet werd al bijna 20 jaar oud. De 3 V's (*Vervanging, Vermindering, Verfijning*), zoals de 3 R's in het Nederlandse taalgebied worden aangeduid, hadden echter nog niet de brede bekendheid en status bereikt die ze thans bezitten. In 1977 werd in art. 10 eerste lid, van de Wod gesteld dat het verrichten van een dierproef verboden was als dat gebeurde voor "een doel dat naar de algemeen kenbare onder deskundigen heersende opvatting

1 Wet op de dierproeven, Stbl nr 67, 12 januari 1977.



ook anders dan door middel van een dierproef kon worden bereikt". Feitelijk is dit de verwoording van de V van *Vervanging*. De andere twee V's werden toen nog niet genoemd. Het tweede lid van artikel 10 bestond in 1977 namelijk uit een verbod op het doen van proeven met aap, paard, hond of kat indien met een andere dan deze diersoorten het doel van de proef ook kon worden verwezenlijkt. Bij de grote revisie van 1996<sup>2</sup> is dit tweede lid komen te vervallen en is artikel 10 uitgebreid met de andere twee V's.

Internationale regelgeving is er sinds 1986 middels de Richtlijn 86/609/EEG van de EU en het verdrag ETS 123 van de Raad van Europa.<sup>3</sup> Beide hebben tot doel de bescherming van (gewervelde) dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Ook vereisen zowel 86/609/EEG als ETS 123 dat een proef alleen mag worden uitgevoerd als er geen alternatief is.<sup>4</sup> Daarnaast wordt een lidstaat (van de EU) of een partij (van de Raad van Europa) verplicht om onderzoek naar alternatieven te stimuleren en te volgen om op die manier zo spoedig mogelijk alternatieven te operationaliseren.<sup>5</sup> Hierbij wordt niet genoemd hoe de lidstaat of partij dit concreet moet invullen.

Daarnaast heeft ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) een onderzoeksinstituut van de Europese Commissie (zie ook de bijdrage van Coecke et al. in deze bundel), richtlijnen opgesteld voor validatiestudies. ECVAM splitst de validatie in enkele fasen op. Eerst moet een methode geprevalideerd worden: na optimalisatie worden alle werkprocessen nauwkeurig en eenduidig beschreven, zodat ze in ieder ander laboratorium zouden kunnen worden uitgevoerd. Daarna volgt de validatie, waarin de alternatieve methode wordt vergeleken met de huidige methode. Daarbij moet de reproduceerbaarheid tussen laboratoria wordt vastgesteld met behulp van een groot aantal stoffen. Het doorlopen van het hele proces kan jaren duren.

Al met al zijn er dus veel nationale en internationale regels die voorwaarden stellen aan het doen van dierproeven. Zo mag een Nederlandse vergunninghouder alleen een dierproef uitvoeren als er geen andere mogelijkheid is en dan met zo weinig mogelijk dieren en met zo weinig mogelijk leed. Ook mag de vergunninghouder niet aan een proef beginnen voordat

2 Wijzigingswet Wet op de dierproeven, Stbl nr 500, 12 september 1996

3 European Treaties Series no 123. Zie ook: <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous.asp?NT=123&CM=8&DF=6/21/2006&CL=ENG>

4 In ETS 123 betreft het art 6 & 7, in 86/609/EEG art 7.

5 In ETS 123 betreft het art 6, in 86/609/EEG betreft het art 23.

een erkende Dierexperimentencommissie (DEC) er een positief advies over heeft uitgebracht. Een DEC toetst een onderzoeksplan ondermeer op het adequaat toepassen van de drie V's. De overheid heeft de Voedsel en Waren Autoriteit (VWA) aangewezen om toe te zien dat de vergunninghouder zich houdt aan de bepalingen in de Wod en de Gwvd.

Dat dit systeem ook daadwerkelijk effect heeft gesorteerd blijkt uit de jaarcijfers van het proefdiergebruik. Sinds 1978 worden jaarlijks diverse overzichtstabellen over dierproeven gepubliceerd door de toezichhoudende dienst.<sup>6</sup> In 1978 werden bijna 1,6 miljoen dierproeven verricht. Het aantal dierproeven is sindsdien steeds verder gedaald. De laatste jaren schommelt het aantal dierproeven rond 680.000: 40-45% van het aantal in 1978. In de evaluatie van de Wod (Freriks et al, 2005) constateren de auteurs dat de Wod een duidelijke bijdrage heeft geleverd aan de daling van het aantal dierproeven, echter er werd ook geconcludeerd dat een verdere daling via de Wod niet meer te verwachten is. Een verdere daling is alleen te bereiken via de invloedssfeer van andere wetten en de uitgebreide ontwikkeling en toepassing van alternatieven.

Dat de praktijk kennelijk weerbarstiger is, heeft uitdrukkelijk te maken met het geschetste duivelse dilemma van de overheid. De Wod verbiedt weliswaar onderzoek als er alternatieven voorhanden zijn, maar tegelijkertijd is er andere wetgeving die bepaalt aan welke testen een stof of product onderworpen moet zijn alvorens het op de markt mag komen. Deze regels kunnen nationaal zijn, maar vele hebben hun basis in EU regelgeving of wereldwijde afspraken.<sup>7</sup> Soms zijn er wel alternatieven beschikbaar, maar is een dergelijke alternatieve methode nog niet gevalideerd of breed geaccepteerd. In zo'n geval kan de alternatieve methode niet als vervanging worden gebruikt omdat daarnaast dan toch ook nog de dierproef moet worden uitgevoerd. Een verdere bijkomstigheid is dat diverse ministeries geld besteden aan het uitvoeren van onderzoek met proefdieren, dan wel regels hebben die anderen verplichten tot het uitvoeren van dierproeven alvorens producenten hun producten mogen vermarkten. Echter, de verantwoorde-

6 Deze overzichten zijn te vinden in Zo doende 2004, 2003, etc. (teruggaand tot 1978). Deze rapportages worden uitgebracht door de Voedsel- en Waren Autoriteit en haar voorgangers: de Keuringsdienst van Waren; de Inspectie Gezondheidsbescherming, Waren en Veterinaire zaken; Staatstoezicht op de volksgezondheid en de Veterinaire inspectie;

7 Een belangrijk internationaal orgaan is de OESO, wier monografieën in zeer veel landen worden gebruikt als de standaard. Ook de EU verwijst bij door haar voorgeschreven dierproeven indien mogelijk naar de OESO methoden.

lijkheid voor de Wod waarin de zorg voor proefdierwelzijn haar neerslag heeft gevonden, ligt alleen bij de Minister van Volksgezondheid Welzijn en Sport (VWS).

### **Verdere ontwikkeling alternatieven**

Door de jaren heen is de overheid op diverse wijzen betrokken geweest bij alternatieven voor dierproeven en de ontwikkeling daarvan. Een aantal initiatieven worden hier besproken.

#### *Het Platform Alternatieven voor Dierproeven*

Ten tijde van de publicatie van de Wod in de jaren zeventig van de vorige eeuw werd de mening nog breed gedragen dat alternatieven voor dierproeven altijd min of meer toevalsbevindingen waren, die werden gedaan tijdens conventioneel onderzoek. Volgens deze zienswijze had het dus geen zin om expliciet te zoeken naar alternatieven. Dit werd daarom dan ook niet gedaan. Echter sinds die tijd veranderde dit beeld geleidelijk (zie ook de bijdrage van Vorstenbosch in deze bundel) en ontstond de overtuiging dat gericht onderzoek naar de ontwikkeling van alternatieven wel degelijk zinvol was.

In 1987 leidde dit inzicht bij de overheid tot het instellen van het Platform Alternatieven voor Dierproeven.<sup>8</sup> In het Platform hebben vertegenwoordigers van alle betrokken ministeries zitting, alsmede vertegenwoordigers van de industrie en dierenbeschermingsorganisaties. Ook werd met de oprichting van het Platform invulling gegeven aan een wens die de Tweede Kamer op 19 juni 1985 had geuit tijdens de behandeling van de Notitie Dierproevenbeleid van de Staatssecretaris van het toenmalige ministerie van Welzijn, Volksgezondheid, Cultuur (WVC), om te komen tot een gecoördineerd beleid op het gebied van onderzoek naar de alternatieven voor dierproeven.<sup>9</sup> De betrokken ministeries zijn:

- Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS). Dit ministerie is verantwoordelijk voor dierexperimenteel onderzoek ten bate van de volksgezondheid. Onder haar verantwoordelijkheid valt de Wod.
- Onderwijs Cultuur en Wetenschappen (OCW). Dit ministerie is verantwoordelijk voor een breed scala van fundamenteel dierexperimenteel

8 Instellingsbesluit Platform Alternatieven voor dierproeven dd 27 augustus 1987, Stcrt 1987 nr. 191, laatstelijk gewijzigd dd 19 november 1999, Stcrt 1999 nr. 226 p. 5.

9 Dit ministerie is in 1994 opgegaan in het Ministerie voor Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS).

onderzoek en voor het (wetenschappelijk) onderwijs waarbij proefdieren worden ingezet.

- Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieuhygiëne (VROM). Onder de verantwoordelijkheid van dit ministerie vindt dierexperimenteel onderzoek plaats naar mogelijke schadelijke effecten van chemische stoffen op de mens, flora en fauna.
- Defensie. Onder de verantwoordelijkheid van dit ministerie wordt proefdieronderzoek uitgevoerd ter preventie en behandeling van de gevolgen van oorlogshandelingen.
- Landbouw Natuur en Voedselkwaliteit (LNV). Dit ministerie is verantwoordelijk voor onderwijs en onderzoek met proefdieren op het gebied van de landbouw, de visserij en het natuurbeheer.
- Sociale Zaken en Werkgelegenheid (SZW). Dit ministerie is verantwoordelijk voor het dierexperimenteel onderzoek naar de mogelijke schadelijke effecten van stoffen op de arbeidsomstandigheden.
- Verkeer en Waterstaat (V&W). Dit ministerie is verantwoordelijk voor het onderzoek verricht naar de kwaliteit van de rijkswateren met behulp van dierexperimenten.

Uitgangspunt bij de instelling van het Platform was dat de ministeries, de industrie en de dierenbeschermingsorganisaties twee gezamenlijke aandachtsvelden hebben. Allereerst de welzijnsaspecten bij alle gebruik van proefdieren, waarbij de aandacht zich richt op de vraag hoe de aantasting van het welzijn van dieren binnen de context van de proef zoveel mogelijk kan worden geminimaliseerd. Dat kan alleen als er voldoende kennis is over de invloed van de diverse componenten die een rol spelen bij het welzijn van het proefdier. Daartoe zou het Platform onderzoek aanmoedigen dat tot verbetering van de levensomstandigheden van proefdieren kon leiden: de V van *verfijning*.

Het tweede aandachtsveld van het Platform zou de ontwikkeling van alternatieven zijn, liefst met projecten die leiden tot een besparing van het proefdiergebruik en die ook buiten het instituut dat met een onderzoeksvoorstel kwam, toegepast kunnen worden. Invulling geven aan deze beide aandachtsvelden door subsidiering van relevant onderzoek was de primaire taak van het Platform.

De primaire taak van het platform is de betrokken ministeries te adviseren over de subsidiëring van alternatieven. Bij de instelling van het Platform werd echter ook bepaald dat het zich zou bezighouden met de inventarisatie, coördinatie en stimulering van onderzoek naar alternatieven, en met de advisering

van onderzoekers over alternatieven.<sup>10</sup> Het Platform zou optreden als een inventarisatiecentrum voor alternatievenonderzoek. Hiervoor was samenwerking met de Vakgroep Proefdierkunde van de Universiteit Utrecht noodzakelijk. Vanuit de inventarisatie kon vervolgens coördinatie van alternatievenonderzoek plaatsvinden. Het Platform mocht ook - naast door de bewindslieden ingezet onderzoek - eigen onderzoek initiëren door derde geldstromen aan te boren, bijvoorbeeld afkomstig van industrie of collectebusfondsen. De derde taak, het informeren en adviseren van onderzoekers over alternatieven, zou op basis van de inventarisatie en coördinatie functie van het Platform gestoeld moeten worden. Aldus zou zij kunnen fungeren als een soort vraagbaak voor onderzoekers waar een min of meer maatgemaakt advies kon worden verstrekt.

Het Platform werd financieel gesteund door de minister van VWS en via de Stichting Fondsenwerving Platform alternatieven voor dierproeven droegen andere ministeries, diverse vergunninghouders, collectebusfondsen en dierenbeschermingsorganisaties financieel hun steentje bij. Jaarlijks werd in *Zo doende* gepubliceerd over de lopende projecten en gehonoreerde subsidieaanvragen. Een commissie van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) stond het Platform bij om de wetenschappelijke kwaliteit van de ingediende voorstellen te beoordelen.

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

In 1994 werd het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA) opgericht als een samenwerkingsverband tussen het Platform en de Universiteit Utrecht. Er bleek namelijk in Nederland een duidelijke behoefte te zijn om uitgebreider inhoud te geven aan de bijtaken van het Platform (inventarisatie, coördinatie van alternatievenonderzoek, advisering aan onderzoekers) door een snelle groei van de nationale én internationale belangstelling voor alternatievenonderzoek. Deze groei vroeg duidelijk om meer gespecialiseerde en uitgebreider inzetbare ondersteuning dan dat het Platform zelf kon bieden. De leden functioneerden in het Platform naast en uit hoofde van hun functie. De taakomschrijving van het Platform bood de mogelijkheid om zich door experts te laten ondersteunen bij haar taken, hetgeen heeft geleid tot de oprichting van het NCA.<sup>11</sup>

10 Artikel 3 van het instellingsbesluit: “*Het Platform heeft tot taak: (a) het adviseren van de Minister van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur alsmede de Ministers wie het mede aangaat, over subsidiëring van alternatieven; (b) het inventariseren coördineren en stimuleren van onderzoek naar alternatieven; (c) het adviseren van onderzoekers over alternatieven.*”

11 Zie <http://www.nca-nl.org/>

### *Een nieuwe taak voor het Platform Alternatieven voor Dierproeven*

In 1997 startte de discussie over het voortbestaan van het Platform. Niet dat de klus van het Platform was geklaard, er werden immers nog steeds ruim 700.000 dierproeven per jaar uitgevoerd, maar met de oprichting van Zorg Onderzoek Nederland (ZON), thans ZonMw, kwam de vraag naar voren of de hoofdtaak van het Platform niet bij ZonMw moest worden ondergebracht. ZonMw is een onafhankelijke intermediaire organisatie die subsidiëring van onderzoek op het gebied van volksgezondheid en preventie voor de Minister van VWS coördineert en begeleidt. In 1999 werd besloten dat het Platform haar taken rond de subsidiëring van onderzoek zou overdragen aan ZonMw.

De financiële ondersteuning van het NCA werd als gevolg van deze ontwikkeling ook door het Platform dat nu geen eigen middelen meer had, aan ZonMw overgedragen. Het NCA dat een belangrijke rol in de ondersteuning van het Platform bij de lopende en afgeronde projecten speelde vervult thans dezelfde rol voor ZonMw: ondersteuning van de commissie, rol in de communicatie en implementatie van de resultaten, etc. Het Platform kreeg nu als taak om de betrokken bewindslieden en andere donoren van onderzoeksprogramma's bij ZonMw, gevraagd en ongevraagd, te adviseren<sup>12</sup>.

Concreet heeft dit de afgelopen jaren betekend dat het Platform wensen formuleerde bij onderzoeksprogramma's en programmavoorstellen en (tussen)evaluaties van ZonMw beoordeelde. Tevens wordt het Platform in haar nieuwe stijl gebruikt om onderwerpen over alternatieven met betrokken stakeholders te bespreken. Het Platform heeft nu meer een signalerende en adviserende rol gekregen over ontwikkelingen en trends op de langere termijn.

### *Alternatievenonderzoek bij ZonMw*

ZonMw (de opvolger van ZON) werkt met programmacycli van een beperkt aantal jaren waar onderzoekers projecten bij kunnen indienen. Een voorbeeld is het programma Dierproeven Begrensd dat tussen 2000-2004 heeft

12 Artikel 3 van het instellingsbesluit na wijziging in 1999 luidt: *“Het Platform heeft tot taak: (a) het gevraagd en ongevraagd adviseren van de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, ten aanzien van het uitoefenen van de bevoegdheden die deze minister heeft op basis van de Wet op de organisatie ZorgOnderzoek Nederland (ZON), voor zover dit betrekking heeft op het aandachtsveld alternatieven voor dierproeven; (b) het gevraagd en ongevraagd adviseren van andere ministers, industriële instellingen en dierenbelangenorganisaties die middelen ter beschikking stellen ten behoeve van het ZON-programma alternatieven voor dierproeven; (c) het in verband met het vorenstaande zorgen voor de noodzakelijke coördinatie en afstemming.”*

gedraaid. In 2005 is Dierproeven Begrensd II van start gegaan. Een subsidie voor een aangevraagd project bedraagt nooit meer dan 70% van de totale kosten. De overige 30% moeten de aanvragers elders financieren. Tot nu toe bleek bij iedere ronde in deze onderzoeksprogramma's het totale bedrag van de ingediende projecten een veelvoud te zijn van het beschikbare budget, zodat slechts 10 tot 20% van de aanvragen gehonoreerd kon worden.

ZonMW heeft een Programmacommissie Alternatieven voor Dierproeven (PrAD) ingesteld. Hierin hebben mensen zitting op persoonlijke titel afkomstig uit bedrijfsleven, academia en dierenbescherming. Daarnaast zijn er enkele waarnemers en adviseurs betrokken (zoals de voorzitter van de wetenschapscommissie van de PrAd, de hoogleraar Alternatieven voor Dierproeven bij de Universiteit van Utrecht, de voorzitter van het hierboven beschreven Platform, en een ambtenaar van het ministerie van VWS). De PrAD wordt bijgestaan door een wetenschapscommissie voor de beoordeling van ingediende voorstellen op wetenschappelijke kwaliteit. Ook overlegde de PrAD met het NCA en wordt het ondersteund door het NCA.

### *Financiering Dierproeven Begrensd II*

Hoewel bij de overdracht van de taken van het Platform naar ZonMw het de bedoeling was dat naast enkele ministeries ook de andere geldschieters van het Platform financieel zouden gaan bijdragen aan het onderzoeksprogramma Dierproeven Begrensd, is hier door ZonMw geen invulling aangegeven<sup>13</sup>. Bij het vervolgprogramma Dierproeven Begrensd II is hiervoor door het Platform en de minister van VWS echter wel aandacht gevraagd. ZonMw is nu begonnen met het concretiseren van deze wens van haar opdrachtgevers. De achtergrond hiervan is dat de financiering van Dierproeven Begrensd II aanvankelijk erg mager leek uit te vallen. Op alle ministeries moest in verband met de economische tegenwind drastisch worden gesneden in de budgetten. Bovendien was jarenlang budget voor onderzoek naar alternatieven niet gecorrigeerd voor inflatie en in 2004 leek er zelfs zo weinig geld beschikbaar te komen dat de daadwerkelijke voortzetting van het programma in gevaar kwam. Bij een Algemeen Overleg tussen de Tweede Kamer en de minister van VWS, beloofde de laatste een forse uitbreiding van het budget, waardoor deze weer op het oude niveau kwam. De belangrijkste geldschieters voor Dierproeven Begrensd II zijn thans VWS en OCW. VROM en LNV

13 Zie toelichting op de wijziging van het instellingsbesluit Platform Alternatieven voor dierproeven, dd 19 november 1999, Stcrt 1999 nr. 226 p. 5.

prefereren een directe subsidierelatie tussen geldschietter en onderzoeker en dragen dus niet bij aan het onderzoeksprogramma Dierproeven Begrensd II.

### **Kansen en bedreigingen nabije toekomst**

Internationaal is er veel beweging te verwachten in de komende tijd. Zo wordt al een paar jaar gewerkt aan een drastische vernieuwing van de EU Richtlijn 86/609/EEG en de bijlagen van het Verdrag van de Raad van Europa ETS 123. Naar verwachting vindt in de zomer van 2006 de Multilaterale Consultatie plaats in de Raad van Europa, waarbij de uitgebreide en herziene bijlagen met richtsnoeren voor de huisvesting, verzorging en behandeling van de meest gebruikte proefdieren zullen worden geaccordeerd. Daarmee zal een stap voorwaarts worden gezet in het dierenwelzijn en de V van *verfijning*.

Een volgende stap is de aanbidding van de lang verwachte herziene teksten van de EU richtlijn aan het Europese Parlement en de Raad van Europa. Berichten geven hoop dat de Europese Commissie rond eind 2006 voorstellen zal indienen. Daarmee kunnen de onderhandelingen over de teksten van start gaan. Er is vanuit de verschillende stakeholders aandacht gevraagd voor een meer concrete aandacht voor de ontwikkeling en acceptatie van alternatieven in de herziene Richtlijn.

De Europese Commissie wil dierenwelzijn duidelijk op de kaart zetten en heeft begin 2006 een Actieplan Dierenwelzijn gepresenteerd waarin ook aandacht wordt besteed aan dierproeven.<sup>14</sup> Naast verwijzingen naar de bovengenoemde herzieningen, heeft de Commissie als doelstelling geformuleerd dat er meer onderzoek naar alternatieven moet worden gedaan. De Commissie wil hieraan mede invulling geven door de oprichting van een Europees centrum of laboratorium voor de bescherming en het welzijn van dieren.

Mede gelet op REACH<sup>15</sup>, het programma waarbij van reeds breed toegepaste “oude” chemicaliën een dossier geschoeid op moderne leest moet

14 Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on a Community Action Plan on the Protection and Welfare of Animals 2006-2010; Brussel, 23.1.2006, COM(2006) 13 final.

Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on a Community Action Plan on the Protection and Welfare of Animals 2006-2010, Strategic basis for the proposed actions; Brussel, 23.1.2006, COM(2006) 14 final.

Annex to the Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on a Community Action Plan on the Protection and Welfare of Animals 2006-2010; Brussel, 23.1.2006, SEC(2006) 65.

15 Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals. Een door de Europese Commissie opgezet programma, waarbij voor reeds op de markt zijnde stoffen die al zo



worden opgebouwd (zie ook de bijdragen van Krul et al., Coecke et al., en Gubbels in deze bundel), is het ook zeer belangrijk alternatieven geaccepteerd te krijgen op korte termijn. Tevens maakt de in de EU gekozen lijn voor cosmetica<sup>16</sup> de ontwikkeling, validatie en acceptatie van alternatieven op korte termijn noodzakelijk. Nederland heeft in dit kader initiatief genomen om aandacht te vragen voor de “omics” wetenschappen als mogelijk belangrijke bijdrage bij het vervangen van de dierproeven in de veiligheidstesten (zie ook de bijdrage van Van Boxel in de bundel). Nationaal en internationaal worden hiervoor activiteiten ontplooid. Ook in het 7<sup>e</sup> kaderprogramma van de EU<sup>17</sup> zal dit op de kaart worden gezet.

Zoals hierboven is aangegeven is het in Nederland de laatste jaren moeilijk gebleken onderzoek naar alternatieven, middels het ZonMw onderzoeksprogramma Onderzoek Begrensd te financieren door de economische tegenwind. Daarnaast is er enige weerstand bij donoren (zowel overheid, als bedrijfsleven, als collectebusfondsen, als dierenbeschermers) om geld te geven aan een vierjarig programma zonder te kunnen meebeslissen over de keuze voor financiering van de ingediende projectvoorstellen. Een andere wijze van opzet van het programma zou dit misschien kunnen verhelpen: potentiële donoren en projectvoorstellen zouden gericht bijeengebracht kunnen worden door ZonMw en NCA, waarbij ZonMw samen met NCA vervolgens de begeleiding van het onderzoek, conform de procedures van de “normale” PrAD-projecten, zou kunnen verzorgen.

Uit de evaluatie van de Wod (Freriks et al., 2005) kwam zoals gezegd al naar voren dat een verdere terugdringing van het aantal dierproeven nauw

oud zijn dat ze dateren van voor de moderne regelgeving op het gebied van toelatingsdossiers, alsnog een modern dossier moet worden opgebouwd. Hierbij zullen onvermijdelijk dierproeven moeten worden gedaan, echter over het totaal aantal lopen de schattingen zeer uiteen. De EU zal in 2006 de Verordening aannemen naar zich nu laat aanzien.

16 Richtlijn 2003/15 Pb 11.3.2003, L66/26, tot wijziging van Richtlijn 76/768 verplicht de lidstaten tot het introduceren van vier verboden, na een bepaalde overgangstermijn:

- Verbod om cosmetica in het verkeer te brengen ontwikkeld met behulp van dierproeven, waarvoor door OECD en EU geaccepteerde gevalideerde alternatieven beschikbaar waren;
- Verbod om cosmetica in de handel te brengen die ingrediënten of combinaties van ingrediënten bevatten, waarvoor een dierproef is verricht terwijl door OECD en EU geaccepteerde gevalideerde alternatieven beschikbaar waren;
- Verbod om op het grondgebied van de lidstaat dierproeven met cosmetica te verrichten (sinds 1996 in Nederland middels de Wod al verboden);
- Verbod om op het grondgebied van de lidstaat dierproeven te verrichten voor ingrediënten of combinaties van ingrediënten (sinds 1996 in Nederland middels de Wod al verboden).

17 Een onderzoeksstimuleringsprogramma van de Europese Unie waarbij internationale samenwerkingsverbanden worden opgezet, zie <http://cordis.europa.eu/fp7/>

samenhangt met beleid op andere terreinen dan de proefdierkunde. Een voorbeeld is de rol van testen op stoffen (zie ook de bijdragen van Honig en van Schoonen & Horbach). Voor de *vervanging* en *vermindering* is het nodig dat ontwikkelde alternatieven ook daadwerkelijk worden ingezet als testen. Bovendien moet bij het voorschrijven van nieuwe testen worden gekeken of een dierproef wel de gouden standaard zou moeten zijn, of dat er een gelijkwaardig of misschien zelfs beter alternatief voorhanden is. Ook door een getrapte aanpak van testen (een vroege stapsgewijze selectie van stoffen die niet voldoen zodat latere dierproeven worden voorkomen) kunnen veel dierproeven sparen. Met de steeds krachtiger wordende computers kan niet alleen uit een dierproef steeds meer data worden verworven, maar kunnen deze data ook worden geïnterpreteerd waardoor alternatieven worden gerealiseerd (zie ook de bijdrage van Ridder). Internationale afspraken (niet alleen binnen de EU) over acceptatie van alternatieve methoden en resultaten uit elkaanders testen en harmonisatie van testmethoden zullen eveneens belangrijke bijdragen kunnen leveren aan minder proefdiergebruik wereldwijd.

### **Tot slot**

De queste naar alternatieven voor dierproeven is een uitdaging waarin overheid, bedrijfsleven, academia en dierenbeschermingsorganisaties elkaar moeten ondersteunen. De door iedereen gewenste uitkomst is het terugdringen van dierproeven. Echter, in hoeverre daarbij eventuele compromissen gedaan kunnen worden aan vooruitgang van de wetenschap en aan de bescherming van de volks- of diergezondheid en het milieu, verschilt voor iedereen. De overheid heeft een taak om op basis van onder deskundigen heersende opvattingen hierin pragmatische keuzes te maken. Voorlopig zal de overheid dan ook het duivelse dilemma niet kunnen oplossen: enerzijds dierproeven voorschrijven en anderzijds deze zoveel mogelijk terugdringen, zonder dat dierproeven naar die buitenlandse landen worden verplaatst waar lagere standaarden door de overheid worden gehanteerd of geaccepteerd. Een verantwoord gebruik van proefdieren door toepassing van de 3 V's en een kritische grondhouding tegenover de noodzakelijkheid van een dierproef, is essentieel.

### **Literatuur**

- Russell W.M.S. & Burch R.L. (1959) *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen.
- Freriks A.A., Meulen B.M.J., Belt H. Van den, Holt H. ten, Verstappen J. (2005) *Noodzakelijk kwaad, evaluatie van de Wet op de dierproeven*. Den Haag: ZonMw.

# De rol van ECVAM in het valideren en implementeren van alternatieven voor proefdieren

*Sandra Coecke, Greetje Elaut en Thomas Hartung*

ECVAM, het Europese Centrum voor de Validatie van Alternatieve Methoden,<sup>1</sup> is een internationaal coördinatiecentrum dat betrokken is bij de ontwikkeling en validatie van alternatieve methoden die het gebruik van proefdieren in de biomedische wetenschappen, met een nadruk op toxiciteitstesten, moet verminderen, verfijnen en/of vervangen. Haar oprichting door de Europese Unie in 1991 houdt verband met de artikelen 7.2 en 23 van EU Richtlijn 86/609/EC die over de bescherming gaat van dieren die gebruikt worden voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden. ECVAM is als onderdeel van het Joint Research Centre (JRC) actief sinds 1992. Zij is onafhankelijk van nationale en private belangen (Hartung et al., 2003).

## **De missie van ECVAM**

ECVAM kent de volgende functies en doeleinden:

- Zij wil de beschikbaarheid van alternatieve methoden bevorderen, ondermeer door hun compilatie in een centrale gegevensbank die online<sup>1</sup> toegankelijk is voor het brede publiek (ECVAM Databank Dienst voor Alternatieve Methoden of DB-ALM).
- Zij wil de communicatie tussen wetgevende instanties en wetenschappers aanmoedigen, alsook die tussen betrokken wetenschappers onderling. Hiertoe worden bijvoorbeeld geregeld workshops en task forces georganiseerd die moeten bijdragen aan het internationaal evalueren van de status van alternatieve testen, hun potentiële toepassingen, en de manieren waarop ze kunnen worden verbeterd. De verslagen en aanbevelingen van deze activiteiten worden gepubliceerd in het wetenschappelijk tijdschrift ATLA (Alternatives to laboratory animals) of in andere internationale wetenschappelijke tijdschriften en worden ter beschikking gesteld op de website van ECVAM.

1 <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

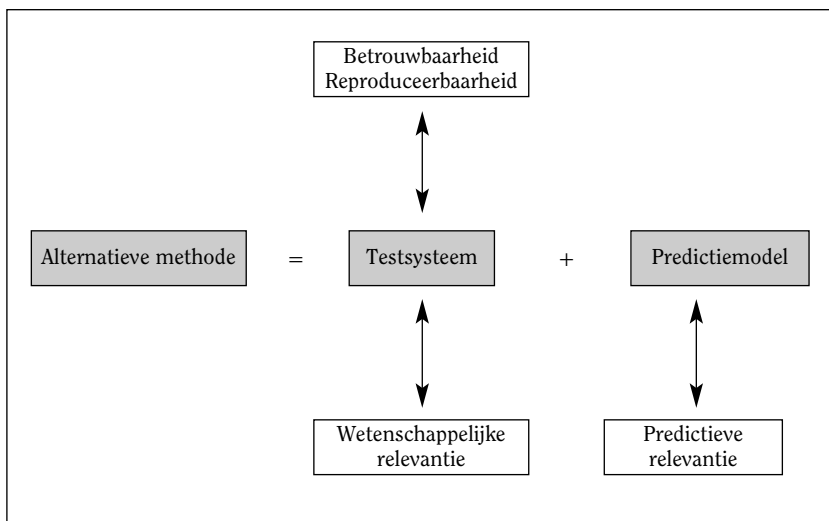
- Zij begeleidt en promoot de ontwikkeling, optimalisatie en validatie (zie figuur 1) van alternatieve methoden op internationaal niveau. Recent werd een internationale consensus over de rol en de uitvoering van validatiestudies van nieuwe of vernieuwde testmethoden gepubliceerd door de Organisatie voor Europese Samenwerking en Ontwikkeling (OECD) (OECD 2004a.).
- Zij neemt actief deel aan validatiestudies in de eigen onderzoeks- en educatieve eenheden van het JRC, en moedigt het aanwenden van reeds gevalideerde en wettelijk aanvaarde alternatieve methoden aan in de verschillende takken van de biomedische wetenschappen.

Gezien de politieke gevoeligheid van haar taak, is de wetenschappelijke basis van het werk van ECVAM belangrijk. ECVAM wordt daarom geadviseerd door een wetenschappelijke raad, de ECVAM Wetenschappelijke Advies Commissie (ESAC), die is samengesteld uit vertegenwoordigers van alle Europese Lidstaten, leden van industriële verenigingen, universiteiten, en dierenwelzijnsorganisaties, en representanten van andere diensten van de Europese Commissie met interesse voor alternatieve methoden.

Een gevalideerde alternatieve methode kan slechts voor goedkeuring en wettelijke aanvaarding aan de regulatie autoriteiten worden voorgelegd met instemming van ESAC. Een communicerend netwerk tussen de OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), de Amerikaanse equivalent van ECVAM, het ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), en andere diensten van de Europese Commissie zoals het Directoraat Generaal (DG) Omgeving, het DG Onderneming, het DG Onderzoek en Ontwikkeling, het DG Gezondheid en Consumentenbescherming, speelt een belangrijke rol in het bereiken van een akkoord tussen de verschillende deskundigen en bij de implementatie van nieuwe methoden op internationaal niveau.

Enkele humane toxische effecten van stoffen kunnen op dit moment al onderzocht worden aan de hand van wettelijk aanvaarde *in vitro* methoden die proefdiermethodieken kunnen vervangen, zoals bijvoorbeeld huid- en oogcorrosie<sup>2</sup>, huidsensitisatie, dermale absorptie en acute fototoxiciteit<sup>3</sup>.

- 2 Het ontstaan van onomkeerbare weefselschade in de huid/het oog na aanbrengen van het testmateriaal.
- 3 Acute toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht, of op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.



*Figuur 1. Een schematische voorstelling van een alternatieve methode en de factoren die van belang voor zijn succesvolle validatie. Een proefdier-vervangende alternatieve methode kan beschouwd worden als de combinatie van een teststelsysteem en een predictiemodel. Het teststelsysteem levert fysicochemische of in vitro data, die dan door het predictiemodel kunnen vertaald worden in een farmacotoxicologisch eindpunt in levende dieren en/of mensen. Bij de validatie van de alternatieve methode moet aldus aangetoond worden dat het teststelsysteem wetenschappelijk relevant is, dat de voorspellingen gemaakt door het predictiemodel voldoende accuraat zijn, en dat de resultaten gegenereerd door het teststelsysteem reproduceerbaar zijn in functie van tijd en laboratorium.*

Andere effecten zoals onmiddellijke toxiciteit voor de organen of voor bepaalde lichaamsfuncties of huidallergie, worden nu geëvalueerd met methodieken die minder dieren vereisen of die daar minder onder zullen lijden. Andere alternatieve methoden voor testen van beenmergtoxiciteit, het testen van pyrogenen<sup>4</sup>, en acute toxiciteit in vissen kregen recent een positief advies van ESAC. Verder worden validatie dossiers betreffende mutageniciteits- en chronische toxiciteitproeven in honden geëvalueerd door ESAC om alzo voor beide domeinen minder proefdieren te kunnen gebruiken. De vervanging van de Limulustest, een pyrogeentest in konijnen, zal naar verwachting resulteren in het besparen van 1 miljoen konijnen en meer dan 250 miljoen Euro per jaar (Hoffmann et al., 2005).

Maar ondanks alle inspanningen, worden in Europa nog steeds ongeveer 10 miljoen proefdieren per jaar gebruikt. Meer dan 50% daarvan is

4 Koortsverwekkende stoffen

bestemd voor onderzoek naar en ontwikkeling van menselijke geneesmiddelen, en voor tandheelkundig en fundamenteel biologisch onderzoek. Ongeveer 16% van de proeven betreft de productie en kwaliteitscontrole van producten en materialen voor medisch, diergeneeskundig en tandheelkundig gebruik. Toxicologische en andere veiligheidsevaluaties nemen ongeveer 10% van dit aantal proefdieren in beslag.

### **De nieuwe Europese chemicaliën wetgeving: REACH**

De publieke afkeuring van het gebruik van proefdieren voor het testen van cosmetische 'luxe' producten is in het verleden een belangrijke stimulans geweest voor de ontwikkeling van alternatieve toxicologische testen in de Europese Unie (EU). Een hoogtepunt werd bereikt in maart 2003, toen het 7de amendement op de Europese Richtlijn 76/768/EEC over de veiligheid van cosmetische producten werd uitgevaardigd. Dit amendement voorziet in een onmiddellijk verbod op het gebruik van proefdieren voor het testen van cosmetische eindproducten, terwijl het *in vivo* testen van ingrediënten slechts mogelijk blijft tot maximaal 6 jaar na implementatie van de richtlijn, dus tot 2009, zie ook de bijdrage van Krul in deze bundel.

Het succes van het 7de amendement impliceert echter niet dat het terugdringen van het gebruik van proefdieren voor toxicologische doeleinden niet langer primeert. Integendeel, de EU heeft besloten om de discrepantie met betrekking tot de beschikbaarheid van toxiciteitgegevens tussen zogenaamde "bestaande" en "nieuwe" chemicaliën, op te heffen. Bestaande chemicaliën zijn voor 1981 op de markt gebracht en nauwelijks getest. Nieuwe chemicaliën zijn nadien op de markt gekomen, en zijn onderworpen geweest aan talrijke toxiciteitstesten en strenge risico-evaluaties, gedefinieerd in Richtlijn 67/548/EEC. De Europese Commissie stelde daarom voor de testvereisten van de twee groepen te harmoniseren door de creatie van het nieuwe REACH systeem dat voor Registratie, Evaluatie en Autorisatie van Chemicaliën staat.<sup>5</sup> Er werd voorzien dat dit systeem begin 2007 geïmplementeerd zal worden. In dit REACH systeem zullen nieuwe chemicaliën een minder strenge toxiciteitevaluatie moeten ondergaan dan in het verleden. Daarentegen zullen ongeveer 30000 stoffen die op dit moment op de markt zijn in volumes groter dan 1 ton per jaar, getest moeten worden. Per product zal de omvang van het toxicologisch dossier bepaald worden door het aantal tonnen dat wordt geproduceerd of geïmporteerd in de EU. Als al deze stoffen

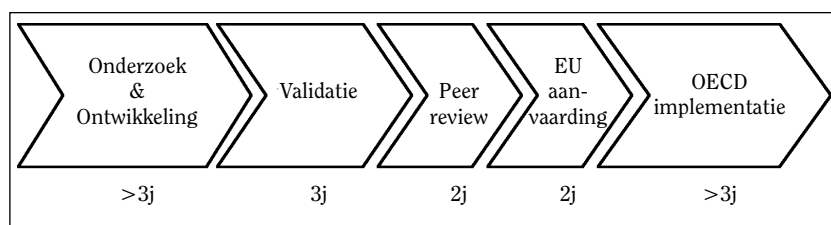
5 <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/REACH.htm>

met de tot nu toe gebruikelijke dierproeven worden getest, kan berekend worden dat dit tot het gebruik van miljoenen proefdieren zal leiden en biljoenen Euro zal kosten. Bovendien is er een tekort aan faciliteiten waar de toxicologische testen kunnen worden uitgevoerd. Dit spreekt duidelijk in het voordeel van het gebruik van proefdierbesparende of -vervangende methoden. Echter, de snelheid van testen met behulp van alternatieve methoden is op dit moment beperkt, aangezien de aanvaarding door de bevoegde Europese en internationale regelgevende autoriteiten erg traag verloopt. Echter vandaag meer dan ooit is duidelijk dat zowel de ethische aspecten als economische beperkingen geassocieerd met REACH een dringende ontwikkeling en validatie van proefdierbesparende alternatieven vergen, zoals *in vitro* methoden (bijvoorbeeld cel- en weefselculturen), *in silico* methoden gebaseerd op structuur-activiteitrelaties (zie het artikel van Ridder in deze bundel) en fysiologische en biokinetische modellen. ECVAM en het Europese Chemicaliën Bureau (ECB) zijn momenteel betrokken bij het schrijven van adviesdocumenten over de praktische implementatie van REACH en op welke manier *in vitro* en *in silico* methoden hierbij kunnen helpen.

### Het antwoord van ECVAM op REACH

Naar aanleiding van REACH en het 7de amendement van de Cosmetics wetgeving heeft ECVAM zich voornamelijk gericht op het valideren van proefdiervervangende methoden. Een dergelijk validatieproces nam in het verleden ongeveer drie jaar in beslag en de daaropvolgende implementatie in de regelgeving zelfs twee tot zeven jaar (figuur 2).

Voor de beperkte beschikbaarheid van referentiestoffen, die gebruikt kunnen worden om de testen te valideren, alsook de beschikbaarheid van kwalitatieve *in vivo* gegevens om de *in vitro* resultaten mee te vergelijken, versterken de behoefte aan verdere optimalisatie van alternatieve testmethoden.



Figuur 2. Schematische presentatie van de tijd nodig voor de ontwikkeling, validatie en regulatorische implementatie van een nieuwe, alternatieve testmethode.

Ook de langdurige financiële en administratieve procedures, en het tijdrovende consensusproces van de wettelijke implementatie, zijn steeds limiterende factoren geweest. Gebaseerd op de tijdslimieten gedefinieerd in het 7<sup>de</sup> amendement van de Cosmetica-wetgeving, moest de validatie van een groot aantal alternatieven dus reeds in 2002 van start zijn gegaan. Ook omdat REACH volgens de planning in 2007 geïmplementeerd wordt, is de snelle beschikbaarheid van gevalideerde alternatieven van cruciaal belang. Om deze doelen haalbaar te maken heeft ECVAM haar diensten geherstructureerd met als doel de ontwikkeling en validatie van proefdiervervangende methoden te versnellen.<sup>6</sup> Verder ondernam ECVAM een aantal belangrijke initiatieven:

### *De compilatie van informatie en methoden, en de bevordering van transparantie van toxiciteitgegevens*

Een lange inventaris van beschikbare alternatieve methoden voor het testen van de toxiciteit van cosmetica werd door 75 experts in 2004 opgesteld en recent gepubliceerd in ATLA.<sup>7</sup> Daarnaast zet ECVAM zich in om chemische producenten te bewegen om meer in-house informatie te verstrekken, inclusief voor de stoffen die getest zijn maar niet op de markt zijn gebracht. Alhoewel bedrijven niet erg bereid zijn deze informatie prijs te geven vanwege de economisch-strategische belangen zou het mogelijk moeten zijn regelingen te treffen waarbij commercieel gevoelige informatie over geteste producten eigendom blijft van de firma. Naar aanleiding van REACH, wordt ook een nieuw 'Europees Chemisch Bureau' opgericht in Helsinki, dat erop moet toezien dat de industrie toxiciteitgegevens deelt met anderen om te vermijden dat een chemische stof meer dan eens eenzelfde test ondergaat.

### *Het aanwenden van innoverende biologische en QSAR technologieën*

De geavanceerde moleculaire patroonanalyse, de zogenaamde "omics-technologie", van o.a. DNA, RNA, en eiwitten<sup>8</sup> en computer-gebaseerde analysemethodieken, vormen veelbelovende nieuwe technologieën voor het bepalen van een aantal toxicologische effecten zoals kankerverwekkende

6 Verschillende werkgroepen zijn hierbij ingesteld: Systemische Toxiciteit, Lokale Toxiciteit, Sensitisatie, Carcinogeniteit, Reproductieve Toxiciteit, Toxicokinetiek en Biotransformatie-gemedieerde Toxiciteit, Ecotoxicologie, Gegevensbank voor Alternatieve Methoden, Biologische Producten, Strategische Ontwikkelingen, Agrochemicaliën en Voedselchemicaliën.

7 <http://www.frame.org.uk/atlafn/atlaintro.htm>

8 Respectievelijk genomics, transcriptomics en proteomics.



eigenschappen (carcinogenomics) en chronische toxiciteit van stoffen. Voor deze laatste doeleinden bestaan op dit moment nog geen bevredigende *in vitro* alternatieven (Corvi et al., 2006).

Veel inspanningen worden ook verricht over het gebruik en de mogelijke validatie van *in silico* methoden die gebaseerd zijn op structuur-activiteitrelaties zoals met de QSAR techniek (Quantitative Structure Activity Relationship) (zie Worth et al., 2004a,b). Een nauwe samenwerking tussen het ECB en ECVAM, onder de hoede van de OECD, heeft als doel een akkoord hierover te bereiken. De eerste formele validatiestudies van (Q)SAR methodieken voor het voorspellen van huidsensitisatie, huidpenetratie, acute toxiciteit in vissen en hormoonverstorende effecten werden gestart in 2004. Alhoewel de impact van QSAR-methodieken nog niet duidelijk is, blijkt uit de berekeningen van ECB dat een reductie van 60% van dierproeven mogelijk is.

### *Coachen van en participatie in Europese onderzoeksprojecten*

Drie grote Europese geïntegreerde projecten werden opgestart. Zij moeten de gerichte ontwikkeling van alternatieven een nieuwe dimensie inblazen:

- *ReProtect* (Hareng et al., 2005). Dit project werd opgestart in juli 2004. Het omvat 27 partners en richt zich op het domein van reproductieve toxiciteit met inbegrip van hormonale verstoringen. In 2006 zullen validatiestudies in samenwerking met de Verenigde Staten worden uitgevoerd.
- *A-Cute-Tox* (Gennari et al., 2004). Dit project ging van start in januari 2005. Het omvat 37 partners en is gebaseerd op een in 2003 gehouden workshop van ECVAM. Dit project beoogt het opstellen van een alternatief voor de klassieke LD<sub>50</sub> test om zonder het gebruik van proefdieren de acute toxiciteit van een stof te classificeren.
- *Sens-it-iv* (Casati et al., 2005). Dit project, waaraan 31 partners deelnemen, werd eind 2005 gestart naar aanleiding van een ECVAM workshop. Het beoogt de ontwikkeling van proefdiervrije teststrategieën voor huid- en longsensitisatie.

In totaal zijn meer dan 90 instituten betrokken bij deze geïntegreerde projecten en werd een kapitaal van ongeveer 50 miljoen Euro uitgetrokken door de EU. Er wordt voorzien dat batterijen van testen alsook de bijbehorende teststrategieën, beschikbaar zullen zijn binnen vijf jaar.

Naast deze grote projecten werden recent ook een aantal validatiestudies en kleinere Europese projecten gestart. Hieronder volgen een aantal voorbeelden.

- *Toxicokinetiek en Metabolisme*. Een strategie voor de opsporing van toxicokinetische en biotransformatie-gemedieerde toxiciteit werd opgesteld tijdens naar aanleiding van o.a. een ECVAM workshop (OECD 2004b, Coecke et al., 2005a, Coecke et al., 2006).
- *Mutageniciteit en carcinogeniciteit*. Twee validatiestudies gingen van start in 2005. Zij evalueren varianten van de celtransformatietest en de *in vitro* micronucleustest<sup>9</sup>. Een nieuw geïntegreerd EU project “Carcinogenomics” voor de voorspelling van kankerrisico van stoffen werd recent positief geëvalueerd.
- *Chronische toxiciteit*. “Predictomics” is een specifiek gericht onderzoeksproject van de EU waarbij 14 partners zijn betrokken en waar modellen en “omics”-technologieën worden ontwikkeld voor de voorspelling van chronische lever- en niertoxiciteit van stoffen.
- *Huidirritatie*. Een ECVAM validatiestudie evalueert verschillende *in vitro* modellen van de huid. Het eindrapport wordt verwacht in 2007.
- *Acute toxiciteit in vissen*. Een proefdiersparende alternatieve methode werd ontwikkeld door ECVAM waarbij het aantal proefdieren tot 40% werd gereduceerd. ESAC oordeelde hier positief over.

### *De introductie van modulaire validatie*

Recente vooruitgangen in nieuwe technologieën (zoals “omics” methodieken, het gebruik van transgene dieren, en *in silico* methoden), vereisen een aanpassing van het op traditionele methoden gebaseerde validatieproces. Bovendien wordt tegenwoordig ook het belang van retrospectieve validatie erkent. Bij retrospectieve validatie wordt gebruik gemaakt van bestaande gegevens van een stof. Ook worden tegenwoordig de grote praktische en financiële inspanningen die geleverd moeten worden voor de studie van één test, ter discussie gesteld. ECVAM heeft daarom voorgesteld het validatieproces meer flexibel te maken, door de verschillende stappen in het validatieproces onder te verdelen in onafhankelijke modules<sup>10</sup> en voor elke module de vereiste informatie te definiëren (Hartung et al., 2004). Wanneer een test aan de vereisten van elke module voldoet, zal de geschiktheid via peer-

9 De micronucleustest is bedoeld om stoffen te signaleren die cytogenetische schade veroorzaken waarbij kleine kernen ontstaan buiten en naast de hoofdkern van de cellen tijdens de telofase van de mitose/meiose, met achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

10 Zoals de definitie van de test, de intra-laboratorium variabiliteit, transfereerbaarheid, interlaboratorium variabiliteit, voorspellende capaciteit, toepasbaarheidsdomein, referentiestandaarden.

review procedures bepaald worden. Uiteindelijk zal de betrouwbaarheid en relevantie van de testprocedure bepaald worden volgens de vroeger gedefinieerde validatieprincipes. Naast de flexibiliteit wat leidt tot versnelling van het hele validatieproces is het grote voordeel van de modulaire validatie dat hij op internationaal vlak toegepast wordt.

### *Het opstellen van intelligente teststrategieën*

Het is duidelijk dat veel van de meer complexe toxicologische eindpunten *in vivo* niet vervangen kunnen worden door één alternatieve methode. Teststrategieën, gebaseerd op een intelligente combinatie van testbatterijen, zullen moeten worden ontwikkeld. Deze maken zowel gebruik van bestaande gegevens, *in vitro* of *in silico* testen en geoptimaliseerde *in vivo* testen, en omvatten vergelijkende studies tussen chemische klassen en evaluaties van mogelijke blootstelling aan stoffen. Berekeningen hebben aangetoond dat het aanwenden van dergelijke teststrategieën het voorspelde aantal proefdieren en de voorziene kosten kan reduceren met 70%.

### *Een actieve deelname aan validatiestudies*

De laboratoria van ECVAM voldoen aan hoge standaarden voor infrastructuur, ruimte en uitrusting. Samen met andere JRC eenheden en externe partners beschikken ze over een opmerkelijke combinatie van technologieën. Ongeveer 20 promovendi, post-doctorale onderzoekers en bezoekende wetenschappers nemen actief deel aan het onderzoek dat de kloof opvult tussen fundamenteel onderzoek aan en validatie van stoffen.

Van belang in dit onderzoek is de ontwikkeling van humane celkweken, gezien de beperkte beschikbaarheid van dierlijke primaire cellen<sup>11</sup> en cellijnen alsook de soortverschillen tussen dier en mens. ECVAM is daarom actief bezig met de revolutionaire stamceltechnologie (Bremer and Hartung, 2004; Pellizzer et al., 2004) om humane cellijnen te ontwikkelen die gebruikt kunnen worden als model voor verschillende humane celtypen. Ook een betere beschikbaarheid van humane cellen uit bloed, waaronder navelstrengbloed (Buzanska et al., 2005, Diodovich et al. 2005) en beenmerg kunnen nieuwe mogelijkheden bieden. Invriezen (cryopreservatie) van humaan bloed (Schindler et al., 2004) is een veelbelovende bron van gestandaardiseerd celmateriaal die de noodzaak van bloeddonatie voor ieder experiment apart omzeilt.

11 Primaire cellen zijn cellen die rechtstreeks afkomstig zijn van weefsel of orgaan en die slechts een beperkte tijd buiten het lichaam kunnen overleven.

Ook dierlijke cellijnen, zoals de van muizen afkomstige Balb 3T3 cellijn, kunnen bijdragen aan de reductie van dierexperimenten. ECVAM speelt tenslotte ook een leidinggevende rol in de introductie van 'Good Laboratory Practice' (GLP) (OECD 2004c) en 'Good Cell Culture Practices (GCCP) (Coecke et al., 2005b) bij het ontwikkelen en valideren van toxicologische *in vitro* testen.

### **Nauwe samenwerking met ICCVAM en OECD**

De bilaterale samenwerking tussen ECVAM en de Amerikaanse tegenhanger, ICCVAM, werd reeds aangegaan in 1995. Deze samenwerking heeft enerzijds als doel de wederzijdse erkenning, aanvaarding en implementatie van wetenschappelijk gevalideerde methoden te bespoedigen, en anderzijds het opstellen van geharmoniseerde OECD protocollen te bevorderen. Hiermee wordt getracht de aanvaarding van gevalideerde alternatieve methoden op internationaal niveau te stimuleren. Gedurende de laatste drie jaar werd de samenwerking tussen ECVAM en ICCVAM nog nauwer. Zo zijn beide organisaties vertegenwoordigd in ESAC, en nemen leden van beide organisaties deel aan elkaars workshops en task forces. Het hoofd van ECVAM is lid geworden van SACATM (Science Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods) in de Verenigde Staten, en van de adviserende comité's van CAAT (Centre for Alternatives to Animal Testing of the Johns Hopkins University) en dat van IIVS (Institute for In-Vitro Sciences). ECVAM en ICCVAM hebben bovendien besloten toekomstige peer reviews in samenwerking uit te voeren.

### **Conclusie**

Als onderdeel van het Europese JRC, speelt ECVAM sinds 1992 een voraanstaande rol in de validatie en Europese implementatie van alternatieve methoden, voornamelijk in het domein van regulatorische toxiciteit. Alhoewel een belangrijke afname in het gebruik van proefdieren reeds verwezenlijkt werd, is het aantal gevalideerde en statutair aanvaarde proefdierversvangende methoden op dit moment nog relatief klein. Echter, gezien de recente wijzigingen in de chemicaliënwetgeving (REACH), alsook het nakend verbod op het *in vivo* testen van cosmetische producten en hun ingrediënten (7<sup>de</sup> amendement Richtlijn 76/768/EEC), is de nood aan gevalideerde *in vitro* en *in silico* methoden hoog. ECVAM wendde zich daarom tot een nieuwe strategie die als doel heeft het traditionele validatie- en aanvaardingsproces van alternatieven voor proefdieren te bespoedigen. Een reeks geïntegreerde projecten, gesponsord door de EU, werden opgestart. Bovendien

worden ook inspanningen geleverd om de samenwerking met andere betrokken instanties te verbeteren, en de transparantie van toxiciteitsgegevens te bevorderen.

## Literatuur

- Bremer S & Hartung T. (2004) The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro – the current status of test development. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 2733-2747.
- Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J & Domanska-Janik K. (2005) Human cord blood-derived neural stem cell line--possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicology In Vitro*, 19: 991-999.
- Casati S, Aeby P, Basketter DA, Cavani A, Gennari A, Gerberick GF, Griem P, Hartung T, Kimber I, Lepoittevin JP, Meade BJ, Pallardy M, Rougier N, Rousset F, Rubinstenn G, Sallusto F, Verheyen GR and Zuang V. (2005) Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*, 33: 47-62.
- Coecke S, Blaauboer BJ, Elaut G, Freeman S, Freidig A, Gensmantel N, Hoet P, Kapoulas VM, Ladstetter B, Langley G, Leahy D, Mannens G, Meneguz A, Monshouwer M, Nemery B, Pelkonen O, Pfaller W, Prieto P, Proctor N, Rogiers V, Rostami-Hodjegan A, Sabbioni E, Steiling A and van de Sandt JJM (2005a) Toxicokinetics and metabolism. *ATLA – Alternative to Laboratory Animals*, 33 S1: 147-175.
- Coecke S, Ahr H, Blaauboer BJ, Bremer S, Casati S, Castell J, Combes R, Corvi R, Crespi CL, Cunningham ML, Elaut G, Eletti B, Freidig A, Gennari A, Ghersi-Egea JF, Guillouzo A, Hartung T, Hoet P, Ingelman-Sundberg M, Munn S, Janssens W, Ladstetter B, Leahy D, Long A, Meneguz A, Monshouwer M, Morath S, Nagelkerke F, Pelkonen O, Ponti J, Prieto P, Richert L, Sabbioni E, Schaack B, Steiling W, Testai E, Vericat JA and Worth A. (2006) Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*, 34: 49-84.
- Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G and Stokes W. (2005b) Guidance on Good Cell Culture Practice. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*, 33: 261-287.
- Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, Blakey DH, Clerici L, Coecke S, Douglas GR, Gribaldo L, Groten JP, Haase B, Hamernik K, Hartung T, Inoue T, Indans I, Maurici D, Orphanides G, Rembges D, Sansone SA, Snape JR, Toda E, Tong W, van Delft JH, Weis B, Schechtman LM. (2006) Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use. *Environmental Health Perspectives*, 114: 420-429.
- Diodovich C, Malerba I, Ferrario D, Bowe G, Bianchi MG, Acquati F, Taramelli R, Parent-Massin D, Gribaldo L. (2005) Gene and protein expressions in human cord blood cells after exposure to acrylonitrile. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19: 204-212.
- Gennari A, Berghe C, Casati S, Castell J, Clemedson C, Coecke S, Colombo A, Curren R, Negro GD, Goldberg A, Gosmore C, Hartung T, Langezaal I, Lessigiarska I, Maas W, Mangelsdorf I, Parchment R, Prieto P, Sintès JR, Ryan M, Schmuck G, Stitzel K, Stokes W, Vericat JA and Gribaldo L. (2004) Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*, 32: 437-459.
- Hareng L, Pellizzer C, Bremer S, Schwarz M and Hartung T. (2005) The Integrated Project ReProTect: a novel approach in reproductive toxicity hazard assessment. *Reproductive Toxicology*, 20: 447-452.
- Hartung T, Bremer S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Fortaner S, Gribaldo L, Halder M, Hoffmann S, Roi AJ, Prieto P, Sabbioni E, Scott L, Worth A and Zuang V. (2004) A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA - Alternatives to Laboratory Animals*, 32: 467-472.

- Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y, Montag-Lessing T, Spreitzer I, Loschner B, van Aalderen M, Bos R, Gommer M, Nibbeling R, Werner-Felmayer G, Loitzl P, Jungi T, Brcic M, Brugger P, Frey E, Bowe G, Casado J, Coecke S, de Lange J, Mogster B, Naess LM, Aaberge IS, Wendel A and Hartung T. (2005) International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *Journal of Immunological Methods*, 298: 161-173.
- OECD (2004a) OECD Test Guideline 34. Validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, Paris. [http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2005\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2005)14) (geraadpleegd op 21.03.2006).
- OECD (2004b) OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, OECD Draft Detailed Review Paper: The use of metabolizing systems for in vitro testing of endocrine disruptors. Paris, in final commenting round, [http://www.oecd.org/document/12/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1898188\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/12/0,2340,en_2649_34377_1898188_1_1_1_1,00.html) (Geraadpleegd op 21.03.2006).
- OECD (2004c) OECD series on Principles of Good Laboratory Practice and compliance monitoring Number 14: Advisory Document of the Working Group on Good Laboratory Practice, The Application of the Principles of GLP to in vitro Studies, Paris, <http://appli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/linkto/env-jm-mono200426> (Geraadpleegd op 17.12.2004).
- Pellizzer C, Bremer S and Hartung T. (2005) Developmental toxicity testing from animal towards embryonic stem cells. *ALTEX- Alternativen zu Tierexperimenten*, 22: 47-57.
- Schindler S, Asmus S, von Aulock S, Wendel A, Hartung T and Fennrich S. (2004) Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *Journal of Immunological Methods*, 294: 89-100.
- Worth AP, Hartung T and Van Leeuwen CJ. (2004) The role of the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) in the validation of (Q)SARs. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 15: 345-358.
- Worth AP, Van Leeuwen CJ and Hartung T. (2004) The prospects for using (Q)SAR in a changing political environment – high expectations and a key role for the European Commission's Joint Research Centre. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 15: 331-343.

# Is REACH *reachable* met minder dierproeven?

*Ineke Gubbels*

In oktober 2003 heeft de Europese Commissie een concept regulering gepubliceerd die in een nieuwe wetgeving voor chemicaliën voorziet. Het REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals) voorstel (Commission of the European Communities, 2003) voorziet in één Europese wet voor zowel nieuwe als bestaande chemicaliën.<sup>1</sup> De huidige regelingen voor nieuwe en bestaande stoffen zijn niet optimaal. Met name voor de bestaande stoffenregulering blijkt de aanpak weliswaar grondig, maar zeer tijdrovend.<sup>2</sup> De tijdspanne om tot de voltooiing van een definitieve risicoschatting van een bestaande stof te komen kan oplopen tot 10 jaar. Van de 30.000 stoffen die op dit moment op de Europese markt zijn, zijn er 140 geprioriteerd in het bestaande Europese stoffen programma. Elders in de wereld (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO) Verenigde Staten en Japan<sup>3</sup>) zijn vergelijkbare programma's geïnitieerd om de bestaande stoffen die in zeer hoge volumes geproduceerd worden (boven 1000 ton per jaar) te evalueren en waar nodig aanvullend onderzoek te doen (EPA, 1990; OECD, 1990).

Omdat de Europese Commissie het niet acceptabel vindt dat van een groot aantal stoffen die binnen de Europese markt geproduceerd en verhandeld worden geen elementaire veiligheidsgegevens bekend zijn, is zij gekomen met het REACH voorstel. Het doel van REACH is te komen tot een systeem waarbij de industrie er zorg voor draagt dat er op adequate wijze wordt omgegaan met het risico van de door haar geproduceerde, geïmporteerde en verhandelde chemische stoffen. Daarvoor zijn adequate gegevens nodig over de inherente eigenschappen van stoffen, de (eco)toxiciteit,

1 Bestaande stoffen waren op de markt vóór 1981 en staan op de EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) lijst (ca. 100.000 stoffen). Zogenaamde "Nieuwe" stoffen zijn na 1981 op de markt gekomen en zijn getest volgens voorgeschreven protocollen (van zowel dier- als niet-dierproeven) en staan op de ELINCS (European List of Notified Chemical Substances) lijst (ca. 3500 stoffen).

2 EU richtlijn 793/93/EEC

3 Japan Challenge Program [www.meti.go.jp/english/information/downloadfiles/JP\\_HPVPprogram.pdf](http://www.meti.go.jp/english/information/downloadfiles/JP_HPVPprogram.pdf).

*Tabel 1. Dierproeven gevraagd binnen de verschillende tonnage categorieën van REACH en aantal proefdieren nodig per stof (gerelateerd aan de vereisten in de verschillende Annexen van REACH).*

| <i>Tonnage</i>                  | <i>Standaard dierproeven</i>   | <i>Aantal proefdieren</i>  |
|---------------------------------|--|----------------------------|
| > 1 ton/jaar<br>(Annex V)       | Local lymph node assay   | 20-22                      |
| > 10 ton/jaar<br>(Annex VI)     | Naast Annex V: huid- en oog irritatie, acute toxiciteit (alle routes indien van toepassing), 28-dagen toxiciteit, reproductie screeningtest, teratologie (1diersoort), toxicokinetiek, acute visticiteit | Annex V +<br>270-1000      |
| > 100 ton/jaar<br>(Annex VII)   | Naast Annex V + VI: 90-day studie, twee generatie studie, langdurige visticiteit, aquatische bioaccumulatie  | Annex V-VI +<br>1800-3600  |
| > 1000 ton/jaar<br>(Annex VIII) | Naast Annex V – VII: afhankelijk van de uitkomst van andere studies: chronische toxiciteit, carcinogeniteit, lange termijn vogelstudies.   | Annex V-VII +<br>1700-3400 |

het gedrag in het milieu en de blootstelling van het milieu, de consument en de werknemer aan deze stoffen. Onder REACH is voorzien dat de industrie veiligheidsevaluaties en risicoschattingen (een zogenaamd Chemical Safety Report) opstelt, risicomangement maatregelen neemt, industriële gebruikers van de stoffen informeert en een registratie indient bij de Europese autoriteiten.<sup>4</sup>

Een van de belangrijkste problemen die door REACH-programma naar voren zullen komen, is het gebrek aan veiligheidsgegevens van de 30.000 bestaande stoffen. Er zijn minimale toxiciteitgegevens beschikbaar in de openbare literatuur en er wordt vermoed dat er binnen de industriële ondernemingen ook slechts beperkte gegevens aanwezig zijn. Een schatting in 1999 (Allanou et al., 1999) liet zien dat voor 14% van de hoog-volume stoffen (is meer dan 1000 ton per jaar op de markt) een pakket van testen heeft ondergaan dat vergelijkbaar is met dat van nieuwe stoffen. Bij 65% bleken minder gegevens te zijn en bij 21% zijn helemaal geen gegevens bekend. Voor stoffen die in lagere volumes geproduceerd of geïmporteerd worden, zijn deze getallen niet anders (RPA 2003). Onder REACH is voorzien om binnen 11 jaar een inhaalslag te maken en de 30.000 chemicaliën te testen en te registreren. Veel van de gegevens die gegenereerd zullen moeten worden, zullen afkomstig zijn uit testen met proefdieren.

4 Europees Agentschap in Helsinki



Er zijn verschillende schattingen gemaakt over het aantal proefdieren dat nodig zal zijn om al de testen uit te voeren. De schattingen variëren van 3,9 tot 45 miljoen (Van de Jagt, 2004; BfR, 2004). De meeste schattingen gaan ervan uit dat alle vereisten per voorgestelde tonnage categorie zoals aangegeven in de tabel op p. 176 ook daadwerkelijk met dierproeven bepaald zullen moeten worden. Wanneer echter de mogelijkheden die REACH zelf biedt ten volle benut worden, zou het aantal benodigde proefdieren aanzienlijk kunnen dalen. Dit is ook in het belang van de chemische industrie omdat de kosten van dierproeven over het algemeen zeer hoog zijn en het gebruik van sommige alternatieven veel goedkoper kan uitvallen.

### **Is een reductie mogelijk?**

In Annex IX van het REACH voorstel worden een aantal mogelijkheden gegeven om testen die vereist zijn voor een bepaalde registratie behorende bij een specifiek tonnage niet uit te voeren, maar te vervangen door een alternatieve test of een onderbouwde wetenschappelijke verklaring waarom een test niet wordt uitgevoerd. We zullen deze mogelijkheden hier bespreken.

#### *Mogelijkheid 1: Het gebruik van bestaande gegevens*

Anders dan in de huidige nieuwe stoffen wetgeving biedt REACH de mogelijkheid om eerder gegenereerde gegevens in de registratie te gebruiken. Dit kunnen literatuurgegevens en (oude) in-house data zijn. Deze data zullen uiteraard wel op bruikbaarheid en validiteit gescreend moeten worden. Er wordt verwacht dat de chemische industrie gegevens heeft die nooit openbaar gemaakt zijn. Deze gegevens kunnen ingebracht worden en voorkomen dat nieuwe dierproeven worden uitgevoerd.

#### *Mogelijkheid 2: Het gebruik van non-GLP studies*

Veel van de testen die ingebracht kunnen worden, voldoen mogelijk niet aan de huidige EU richtlijnen voor toxiciteitstesten. Dat wil echter niet zeggen dat de uitkomsten niet betrouwbaar en bruikbaar kunnen zijn. Het is bijvoorbeeld overbodig om een LD50 bepaling, die uitgevoerd is volgens oude richtlijnen met een groot aantal dieren, over te doen met een andere test en dus minder dieren, alleen maar omdat de testmethode op dit moment niet meer geaccepteerd wordt. De gegevens zijn nog steeds waardevol en bruikbaar. Onder REACH kunnen dergelijke studies dus gebruikt worden in de veiligheidsevaluatie.

### *Mogelijkheid 3: Het gebruik van historische humane gegevens*

Voor een groot aantal stoffen op de markt zullen humane toxiciteitgegevens bestaan. Immers de stoffen zijn jaren door mensen gebruikt en met name probleemgevallen zullen onderzocht of beschreven zijn. Door gebruik te maken van deze gegevens kunnen mogelijk proeven met het diermodel voorkomen worden omdat de werkelijke doelgroep reeds is getest.

### *Mogelijkheid 4: De “weight-of-evidence” benaderingen*

Het is mogelijk dat de gegevens gevonden onder de drie hierboven beschreven mogelijkheden op zich niet voldoende zijn voor de veiligheidsevaluatie en het onderzoek naar een specifiek eindpunt wat betreft de toxiciteit. Echter in een aantal gevallen zal de combinatie van onderzoeken die beschreven zijn voldoende zekerheid kunnen geven. Dit wordt een “weight-of-evidence” genoemd. Met deze benadering is met name in Amerika veel ervaring opgedaan (EPA, 1990). Het is echter bekend dat de Europese autoriteiten vaak moeite hebben met deze benadering omdat zij gewend zijn te werken met testmethoden die formeel gevalideerd zijn door de OESO en de EU.

### *Mogelijkheid 5: Het gebruik van (Q)SARs*

QSAR staat voor Quantified Structure Activity Relationship. Een (Q)SAR geeft een (wiskundige) relatie tussen de structuur en een daarmee verbonden inherente eigenschap van een chemische stof en een toxicologisch eindpunt (Zie ook de bijdrage van Ridder). QSARs worden m.n. in de ecotoxicologie al veel gebruikt. De octanol-water partitiecoëfficiënt blijkt een goede voorspeller van opname van chemische stoffen door waterorganismen te zijn en daarmee van toxiciteit voor deze organismen. Echter niet alle chemische stoffen vertonen een structurele gelijkenis. QSARs hebben daardoor alleen een voorspellende waarde voor chemische stoffen die binnen het domein van de QSAR vallen. Hiermee is meteen ook een nadeel van QSARs beschreven. Voor iedere chemische groep zal een andere QSAR van toepassing zijn.

Binnen REACH mogen gevalideerde QSARs gebruikt worden om dierproeven te vervangen. Op dit moment is er nog discussie over de wijze van validatie van QSARs. Wanneer de validatieprocedure voor QSARs gaat lijken op de OESO procedures voor validatie van testrichtlijnen die dierproeven beschrijven zal dit echter een zeer tijdrovende exercitie worden, die mogelijk te laat voltooid zal worden om nog voor REACH van toepassing te kunnen zijn.

### ***Mogelijkheid 6: Het gebruik van in vitro testen***

Op dit moment wordt er volop gewerkt aan de ontwikkeling van *in vitro* testen die dierproeven kunnen vervangen. De focus ligt vooral op testen die lokale effecten zoals huid- en oogirritatie en corrosiviteit kunnen voorspellen. De huidige methodieken om deze eindpunten met proefdieren te bepalen zijn vaak zeer dieronvriendelijk. Een aantal alternatieve testen, zoals die voor huidcorrosiviteit en fototoxiciteit zijn al gevalideerd en voor huid- en oogirritatie worden nieuwe OESO richtlijnen binnen afzienbare tijd verwacht. Voor systemische effecten lijkt een één op één vervanging van een dierproef door een *in vitro* test niet haalbaar. Er wordt gewerkt aan de ontwikkeling van testbatterijen en geïntegreerde benaderingen die naast *in vitro* testen andere alternatieve methoden gebruiken (Van der Jagt 2003, Van Leeuwen 2005, Gubbels-van Hal 2005).

Annex IX van REACH benadrukt dat het gebruik van gevalideerde *in vitro* methoden gestimuleerd moet worden. Op dit moment lijkt dit slechts ten dele een haalbare zaak.

### ***Mogelijkheid 7: Het gebruik van “read-across” of groepsbenadering***

Vele stoffen die binnen REACH geregistreerd zullen moeten worden, zijn onderdeel van chemische groepen. Dat zijn groepen van chemicaliën die een structurele gelijkheid vertonen, dat wil zeggen dat de stoffen gelijke moleculaire afbraakproducten (metaboliëten) of voorlopers (precursors) hebben, een gelijke functionele groep bezitten of in een bepaald chemisch patroon vallen. REACH pleit ervoor dat stoffen in groepen geregistreerd worden waarbij een (aantal) representatieve stof(fen) voor de groep getest worden met gebruikmaking van proefdieren. Wanneer de uitkomsten van deze testen niet afwijken van wat op grond van chemische en toxicologische kennis wordt verwacht, hoeven de andere groepsleden niet meer getest te worden. Dit proces heet read-across en is binnen de VS zeer veel toegepast op de hoog-volume stoffen.

### ***Mogelijkheid 8: Het niet uitvoeren van testen om technische redenen***

Voor een aantal stoffen zal testen niet mogelijk zijn omdat de fysisch-chemische eigenschappen van de stof dit niet toelaten. Een voorbeeld hiervan is een vistest voor een vluchtige, slecht wateroplosbare stof.

### ***Mogelijkheid 9: Het niet uitvoeren van testen op basis van gegevens over blootstelling***

Wanneer uit de gegevens over gebruik van een stof blijkt dat consumenten of werkers niet blootgesteld worden aan een bepaalde stof, hoeft deze stof niet getest te worden. Dit geldt bijvoorbeeld voor intermediaire stoffen die tijdens een proces in een gesloten systeem gevormd worden en vervolgens tot andere stoffen verder reageren. Daarnaast kan ook op basis van de blootstelling in een aantal gevallen een individuele test binnen het vereiste pakket niet uitgevoerd te worden, bijvoorbeeld aquatische testen voor een stof die zeer snel hydrolyseert.

### **Discussie en conclusie**

Alle bovengenoemde mogelijkheden kunnen en moeten gebruikt worden om het aantal dierproeven nodig om aan de REACH vereisten te voldoen te verminderen tot mogelijk 1,9 tot 7,5 miljoen (van de Jagt et al, 2004; BfR, 2004). Echter in alle gevallen zal de validiteit van de alternatieve gegevens door deskundigen bepaald moeten worden; immers het doel van de REACH wetgeving is het verkleinen van de risico's verbonden met het gebruik van chemische stoffen. Gebruik van betrouwbare, valide uitgangspunten is hierbij uiteraard een voorwaarde. De "weight-of-evidence" benadering waarbij mogelijk ook *in vitro* testen, QSARs en read-across betrokken kunnen worden, biedt veel kansen om het aantal proefdieren te verminderen. Dit is bijvoorbeeld duidelijk gebleken bij de testprogramma's die in de Verenigde Staten zijn opgesteld n.a.v. het programma voor hoog volume stoffen. Door groepsbenadering, QSARs en weight-of-evidence is het aantal gevraagde nieuwe dierproeven daar beperkt gebleven. Het ligt in de verwachting dat dit in Europa niet anders zal zijn. De weight-of-evidence benadering heeft ook nog het bijkomende voordeel dat niet formeel gevalideerde *in vitro* testen en QSARs ingebracht kunnen worden, omdat deze niet de enige "evidence" vormen, maar aanvullend gebruikt worden.

De één op één vervanging van dierproeven door QSARs of *in vitro* testen lijkt op korte termijn alleen haalbaar voor lokale effecten. Voor systemische effecten, zoals sensibilisatie, subacute en semi-chronische toxiciteit, reproductie- en ontwikkelingstoxiciteit, lijkt nog een lange weg te gaan. Het wordt verwacht dat voor de systemische toxiciteit het meeste onderzoek binnen REACH nodig zal zijn, doordat veel stoffen niet op deze eindpunten getest zijn. Het gaat hierbij om studies met vaak grote aantallen proefdieren.

Voor de systemische toxiciteit lijkt de groepsbenadering de meeste kansen te bieden om proefdieronderzoek te beperken. Immers wanneer van een groep één van de stoffen is onderzocht (met proefdieronderzoek) kan de uitkomst voor de hele groep gelden. Dit kan een enorme besparing van proefdieren opleveren, zeker wanneer het over de bovengenoemde systemische eindpunten gaat.

In het onderstaande diagram is de haalbaarheid van de in Annex IX genoemde alternatieven voor dierproeven nogmaals samengevat.

*Tabel 2. Indicatie van tijdsfad voor het gebruik van alternatieven.*

| <b>Termijn</b>                 | <b>Mogelijkheden</b>   |
|--------------------------------|--|
| Korte termijn (1-2 jaar)       | Bestaande gegevens/weight-of-evidence/read-across/groepsbenadering                     |
| Middellange termijn (3-5 jaar) | <i>In vitro</i> testen lokale toxiciteit<br>QSARs lokale toxiciteit                    |
| Lange termijn (5-10 jaar)      | <i>In vitro</i> testen / QSARs<br>Geïntegreerde benadering voor systemische toxiciteit |

Het is moeilijk om in te schatten hoeveel proefdieren door de bovengenoemde benaderingen bespaard zullen worden. Een indicatie is te vinden in een evaluatie van 13 nieuwe stoffen. Deze stoffen zijn als een groep behandeld door de autoriteiten. Voor een van de stoffen waren gegevens beschikbaar. Met behulp van de groepsbenadering en read-across is er uiteindelijk nog een andere stof in de groep volledig getest in proefdieren, daarnaast zijn voor een aantal stoffen nog beperkte kleine proeven gedaan. In de klassieke benadering zouden 1560 proefdieren nodig zijn geweest, terwijl er bij deze evaluatie 200 dieren zijn gebruikt. Wanneer dergelijke benaderingen binnen REACH worden geaccepteerd en doorgevoerd, is dus een enorme winst te behalen.

Het lijkt voor de hand te liggen dat de bovengenoemde methoden door industrie en overheid omarmd zullen worden om proefdieren, tijd en geld te besparen. Er zijn echter een aantal problemen. In de eerste plaats zijn alternatieve methoden bij zowel industrie als overheid onbekend. Dit kan leiden tot een conservatieve houding t.a.v. alternatieve testmethoden en strategieën waardoor uiteindelijk toch voor een dierproef wordt gekozen omdat die zeker geaccepteerd wordt. Daarnaast kost het ontwikkelen van een teststrategie tijd. Gezien de tijdsdruk binnen REACH (stoffen in de eerste tonnage categorieën moeten binnen een periode van 3-5 jaar geregistreerd zijn) zou dat een keuze voor een alternatieve benadering kunnen

belemmeren omdat een chemisch bedrijf wel met zijn product op de markt wil blijven. Tenslotte zijn met name *in vitro* testen vaak nog veel duurder dan het *in vivo* model. Dit maakt de verleiding om te kiezen voor de (zekere) dierproef groot. Vanuit wetenschap en overheid ligt hier een duidelijke taak om de alternatieve methoden te ontwikkelen en te propageren. Dit zou in nauwe samenwerking met industriële ondernemingen en organisaties moeten gebeuren om binnen de industrie een platform voor alternatieven te creëren. Binnen de EU is hier zeker aandacht voor (zie ook de bijdrage van Coecke et al. in deze bundel) en ook de industrie beseft meer en meer het belang van deze aanpak (zie bijvoorbeeld de bijdragen van Ridder en van Schoonen & Horbach in deze bundel).

Op dit moment zijn er veel ontwikkelingen gaande op het gebied van alternatieven. Er zijn *in vitro* modellen ontwikkeld voor huidcorrosie, fototoxiciteit, huid- en oogirritatie. Ontwikkelingen op het gebied van meer complexe eindpunten als reproductietoxiciteit, neurotoxiciteit, sensibilisatie en carcinogeniteit zijn in volle gang. Er worden batterijen van QSARs ontwikkeld voor o.a. carcinogeniteit, endocriene disruptie en sensibilisatie. Al deze activiteiten zijn gericht op vervanging en vermindering van proefdieren. In feite ligt het voor de hand om een combinatie van alle beschikbare methoden te gebruiken om zoogdiertoxiciteit te voorspellen. Dit gebeurt in zogenaamde geïntegreerde methoden, die QSARs en *in vitro* testen gebruiken om samen met informatie over de kinetiek een model te genereren dat toxiciteit afdoende kan voorspellen. In dit kader kunnen verschillende initiatieven genoemd worden o.a. van de Gezondheids Raad (Gezondheidsraad, 2001) en het ECVAM (A-cute tox). De methodiek is inmiddels uitgeprobeerd voor industriële chemicaliën en lijkt veel belovend (Gubbels-van Hal, 2005).

Samenvattend is te zeggen dat REACH zowel door de enorme aantallen stoffen die geregistreerd moeten worden als door haar eigen indicaties (Annex IX) een grote kans is om alternatieve testmethoden te ontwikkelen en ingang te doen vinden. Hierdoor kunnen zeer veel proefdieren worden bespaard. Tevens moet deze ontwikkeling aangegrepen worden om tot teststrategieën te komen die het proefdiergebruik minimaliseren of zelfs uitbannen. Dat laatste lijkt echter een kwestie van heel lange adem.

### **Dankzegging**

Met dank aan Helma Barentsen en Carla Bol voor hun bijdrage aan dit document.

## Literatuur

- Allanou R., Hansen B., van der Bilt Y (1999) Public availability of data on EU High Production Volume Chemicals.
- BfR (2004) New EC chemicals legislation: Animal welfare and consumer protection are reconcilable. EC (1993) Council Regulation (EEC) 793/93 on the Control and Evaluation of the Risks of Existing Substances.
- EPA (1990) High Production Volume (HPV) Challenge Program ([www.epa.gov/chemrtk](http://www.epa.gov/chemrtk))
- Gezondheidsraad (2001) Onderzoek Gezondheidsrisico's Stoffen: een gerichtere Benadering. Gezondheidsraad, Den Haag 2001; publication no. 2001/24.
- Gubbels-van Hal W., Blaauboer B., Barentsen H., Hoitink M., Meerts I., Van der Hoeven J. (2005) An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42(3): 284-295.
- OECD (1990) OECD Programme on the Investigation of Existing Chemicals, ([www.oecd.org/scripts/hpv](http://www.oecd.org/scripts/hpv))
- Production Volume Chemicals. EUR 18996 EN (<http://ecb.jrc.it>).
- Commission of the European Communities (2003) Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency and amending Directive 199/45/EC and Regulation (EC) {on Persistent Organic Pollutants}. Brussels, 29 October 2003 (COM(2003)644).
- RPA (2003) Revised assessment of the business impacts of new regulations in the chemicals sector, Draft final report, prepared for DG ENTR (cited in Pedersen F, de Bruijn J., Munn, S., van Leeuwen K., 2003 Assessment of additional testing need under REACH)
- Van der Jagt K., Munn S., Tørsløv J., de Bruijn J. (2004) Addendum to the report "Assessment of additional testing needs under REACH. Effects of (Q)SARS, risk based testing and voluntary industry initiatives"
- Van Leeuwen et al. 2005 Integrated testing strategies ([www.ecb.jrc.it](http://www.ecb.jrc.it))

# Nieuwe Europese regelgeving geeft aanzet tot slimmer testen van toxiciteit

*Cyrille Krul, Andreas Freidig, Han van de Sandt*

In Nederland worden jaarlijks circa 630 duizend proefdieren gebruikt binnen het onderwijs, het testen van vaccins en het testen van de veiligheid van geneesmiddelen en chemische stoffen.<sup>1</sup> De afgelopen jaren is in Nederland 5-7 % van het totale aantal dierproeven verricht in het kader van onderzoek naar mogelijke schadelijkheid van stoffen. De producenten van deze stoffen zijn door de overheid verplicht om dit type onderzoek uit te voeren om de consument, de werknemer en het milieu te beschermen tegen negatieve effecten. Sinds enige jaren is er een nieuwe Europese wetgeving in voorbereiding op het gebied van veiligheid van chemische stoffen en cosmetica, namelijk de richtlijn REACH (Registratie, Evaluatie en Autorisatie van Chemische stoffen (Commission of the European Communities, 2003) en het 7de amendement op de cosmetica.<sup>2</sup> Beide regelgevingen hebben invloed op proefdiergebruik, maar de invalshoek is toch erg verschillend.

## **Cosmetica**

Het 7de amendement op de cosmetica verordening verbiedt in Europa het gebruik van dierproeven voor het testen van cosmetische producten. Daarnaast mogen een groot aantal toxiciteitstesten vanaf 2009 niet meer worden uitgevoerd en het is de bedoeling dat vanaf 2013 geen enkele dierproef meer wordt gedaan om de veiligheid van cosmetische ingrediënten te testen. In 2003 heeft de Europese Commissie aan het European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM, Ispra, Italië) gevraagd een inventarisatie te maken van de mogelijkheden van alternatieve testmethoden, welke gebruikt zal worden om een tijdschema te maken voor het beëindigen van dierproeven voor het testen van cosmetica. Bij deze activiteit waren 75 wetenschappelijke experts betrokken uit verschillende organisaties (academici,

- 1 VWA (Voedsel en Warenautoriteit) Zo doende 2004. [http://www2.vwa.nl/CDL/files/15/1004/11326%20Zo\\_doende\\_2004%20.pdf](http://www2.vwa.nl/CDL/files/15/1004/11326%20Zo_doende_2004%20.pdf)
- 2 Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.



onderzoeksinstituten, maatschappelijke organisaties, industrie en overheden). De bevindingen van deze werkgroepen zijn recent gepubliceerd (Eskes & Zuang, 2005).

Sommige eindpunten kunnen nu al met *in vitro* methoden worden vastgesteld (acute fototoxiciteit, huidcorrosie, genotoxiciteit en huidabsorptie) en het wordt verwacht dat dit op relatief korte termijn ook voor oog- en huidirritatie zal gaan lukken. Op dit moment is het voor complexere eindpunten (systemische toxiciteit) onwaarschijnlijk dat de huidige dierproeven, binnen afzienbare tijd, volledig vervangen kunnen worden door alleen *in vitro* studies. Echter de betrokkenheid van consumenten en publieke druk om proefdiergebruik voor cosmetica te verminderen, is dusdanig groot dat nieuwe geïntegreerde teststrategieën zullen moeten worden ontwikkeld, om dierproeven te vervangen (of te verminderen). Hierbij dient te worden opgemerkt dat in Nederland géén en in Europa slechts een zeer klein percentage van de proefdieren gebruikt wordt voor het testen van cosmetica (0.025% van alle proefdieren).

### **Industriële chemicaliën**

De EU richtlijn REACH is nog niet van kracht (waarschijnlijk zal de richtlijn in 2007 in werking treden) maar de grote lijnen van deze wetgeving zijn al wel duidelijk. Het doel van REACH is het verbeteren van de volksgezondheid en bescherming van het milieu. Hiervoor moeten alle stoffen worden geregistreerd die in een hoeveelheid van meer dan 1 ton worden geproduceerd of in de EU worden geïmporteerd, en moeten gegevens over veilig gebruik van deze stoffen worden overlegd aan de autoriteiten. Van stoffen die na 1981 op de markt zijn gebracht, is veel bekend over hun toxiciteit (de vereisten zijn in Nederland vastgelegd in de Wet Milieugevaarlijke Stoffen), maar van de stoffen die voor 1981 op de markt zijn gekomen, zijn weinig of geen gegevens beschikbaar. De laatste categorie is veel groter dan de eerste en omvat ca. 30.000 stoffen waarover nu gegevens over toxiciteit beschikbaar moeten komen. In tegenstelling tot 7de amendement op de cosmetica verordening verbiedt REACH niet het gebruik van dierproeven. In het huidige voorstel staan juist veel verplichtingen waarvoor dierproeven noodzakelijk zijn. Hoe hoger het volume van een stof, hoe meer gegevens (en meer dierproeven) vereist zijn. De grote uitdaging is om naast nieuwe testen ook nieuwe teststrategieën te ontwikkelen zodat het proefdiergebruik geminimaliseerd wordt, zonder dat dit ten koste gaat van de veiligheid. In Annex XI van REACH wordt ook expliciet de mogelijkheid geboden om maximaal gebruik te maken van *in vitro* modellen, computermodellen en van epidemiologische gegevens.

De REACH wetgeving is nog niet in werking getreden. Wel heeft de Europese Commissie een aantal projecten gestart die een aantal inhoudelijke aspecten moeten uitwerken: de zogenaamde REACH Implementatie Projecten (RIPs). Een van deze projecten is genaamd “Informatievereisten voor de intrinsieke eigenschappen van stoffen”<sup>3</sup> en betreft vooral het ontwikkelen van nieuwe aanpakken om met zo min mogelijk proefdieren de werknemers, consumenten en het milieu optimaal te beschermen. Het eerste verkennende deel van dit project is gedurende de eerste helft van 2005 uitgevoerd door een consortium van overheden, bedrijfsleven en onderzoeksinstituten. In dit project zijn verschillende methoden om toxiciteitsgegevens te genereren (*in vitro* gegevens, *in vivo* gegevens, computermodellen, gegevens over chemische structuurverwantschap) systematisch onderzocht. Voor een aantal toxiciteitseindpunten (reproductietoxiciteit, lokale toxiciteit) zijn er beslisbomen ontwikkeld waarbij getracht is om optimaal gebruik te maken van alternatieve methoden. Binnen de beperkte tijd die beschikbaar was, bleek het niet mogelijk om in alle gevallen consensus tussen de te bereiken onder de leden van het consortium over de (on)mogelijkheden van alternatieve aanpakken.<sup>4</sup> Om REACH tot een succes te maken is het echter essentieel dat de verschillende betrokken groepen het eens worden over de afweging tussen bescherming van bevolking en milieu enerzijds, en gebruik van proefdieren anderzijds.

De REACH Implementatie Projecten hebben als doel om bij aanvang van REACH bruikbare richtlijnen te hebben voor zowel industrie als voor overheden over de vraag hoe de risico-beoordeling moet worden uitgevoerd en welke testen hiervoor noodzakelijk zijn. Daarnaast zijn er een aantal EU onderzoeksprojecten gestart om de ontwikkeling van alternatieven te stimuleren en hun gebruik in de risico-evaluatie te vergroten. Een tweetal voorbeelden zijn het EU Project “ReProTect” welke als doel heeft om vernieuwende *in vitro* methoden en teststrategieën te ontwikkelen in het veld van reproductietoxicologie (zie ook de bijdrage van Coecke et al. in deze bundel). Daarnaast wordt in het EU project “CAESAR” gewerkt aan de ontwikkeling van verbeterde Quantitatieve Structuur Activiteit Relaties (QSAR) binnen de humane toxicologie. Beide projecten hebben als doel de ontwikkeling en acceptatie van alternatieve methoden te versnellen.

3 “Information requirements on the intrinsic properties of substances”

4 RIP3.3-1 final report (August 2005). Three point three – a project for the information requirement of REACH. <http://ecb.jrc.it/REACH/>

## **Acceptatie van alternatieve testmethoden**

De langzame implementatie van alternatieve test methoden bij zowel industrie als bij overheden, wordt als een van de grootste knelpunten gezien voor de vervanging van dierproeven. Om de acceptatie te kunnen versnellen moet inzicht verkregen worden in de factoren die een rol spelen bij de acceptatie van alternatieve testmethoden. Allereerst spelen technische factoren een belangrijke rol. Alternatieve methoden moeten wetenschappelijk valide zijn; ze moeten betrouwbaar en reproduceerbaar zijn waarbij kwaliteitseisen (zoals Good Laboratory Practice) een rol kunnen spelen. Bovendien moet de voorspellende waarde ten opzichte van de mens en het milieu hoog zijn.

Daarnaast zijn ethische aspecten van groot belang. Hierbij speelt de mate van ongerief dat gepaard gaat met de uitvoering van proeven een rol en de aantallen dieren die er mee gemoeid zijn. Verder wordt bij hogere diersoorten, zoals (mens)apen, een andere afweging gemaakt dan bij knaagdieren (zie ook de bijdrage van Stafleu in deze bundel). Ook economische factoren mogen hierbij niet over het hoofd worden gezien. Naast de ontwikkeling van nieuwe methoden is er voor de validatie en het verantwoord implementeren van alternatieven veel geld nodig. Alternatieve methoden zijn niet per definitie goedkoper dan dierproeven, bovendien leveren ze naast meer informatie soms ook meer vragen op.

Tenslotte spelen maatschappelijke factoren een belangrijke rol. Bij vervanging (en vermindering) van dierproeven speelt verantwoordelijkheid voor bescherming van consument, werknemer en milieu een grote rol. De doelstelling van een proef en de mogelijke onzekerheid over de uitkomst zijn hierbij van belang. Als het gaat om de risicoschatting van maatschappelijk belangrijke risico's (zoals reproductietoxiciteit en carcinogeniteit) worden alternatieve methoden minder snel geaccepteerd dan voor b.v. acute huidirritatie.

Zoals ook in de RIPs naar voren is gekomen, moet er een gedegen afweging gemaakt worden tussen bescherming van de bevolking en milieu enerzijds en gebruik van proefdieren anderzijds. Daarbij is het van groot belang vast te stellen hoeveel onzekerheid we als maatschappij willen en kunnen accepteren om te voorkomen dat veiligheidsmarges voor het gebruik van stoffen onacceptabel en onwerkbaar groot worden. In veel gevallen blijken *in vitro* methoden tot nu toe niet voldoende zekerheid te bieden. De vraag is nu wat kunnen we doen om de onzekerheden te verkleinen, of beter, het vertrouwen te vergroten? Hierbij kunnen we kijken naar een gebied waar *in vitro* methoden al vele jaren een essentieel onderdeel zijn van een stapsgewijze

wijze teststrategie, namelijk bij het screenen van stoffen op hun genotoxiciteit, de mate waarin stoffen erfelijk materiaal kan beschadigen.

### **Screenen van stoffen op genotoxiciteit**

De potentie van een stof om genetische schade te induceren moet worden beoordeeld omdat deze stoffen kanker of erfelijke ziekten kunnen veroorzaken. Sinds begin jaren 80 zijn een groot aantal *in vitro* genotoxiciteitstesten ontwikkeld. Een aantal zijn geaccepteerd en worden in een stapsgewijze teststrategie toegepast. De eerste stap is bedoeld om potentieel genotoxische verbindingen te identificeren. Hiervoor worden *in vitro* testen gebruikt die verschillende type genetische schade kunnen meten, namelijk primaire DNA schade, puntmutaties en chromosoomafwijkingen.<sup>5</sup> De *in vitro* testen worden op een dusdanige wijze uitgevoerd dat zij zeer gevoelig zijn, zodat de kans op vals-negatieve<sup>6</sup> resultaten erg laag is. Dit heeft als gevolg dat in de tweede stap, alleen positieve *in vitro* data *in vivo* worden getoetst; er vindt dus geen bevestiging van negatieve *in vitro* data plaats. Eventueel kunnen in een derde stap specifieke data gegenereerd worden voor de risico-beoordeling, waarbij blootstelling en kinetiek van de stof een belangrijke rol spelen.

Opvallend is dat in de genetische toxicologie ook negatieve *in vitro* data volledig geaccepteerd worden. Dit houdt in dat men een negatieve uitslag inderdaad als een definitieve afwezigheid van genotoxiciteit beschouwd waardoor het aantal noodzakelijke dierproeven in deze gevallen beperkt blijft. De reden voor dit vertrouwen is waarschijnlijk dat het eindpunt genetische toxiciteit wordt gescreend in een batterij van *in vitro* testen, elk met een eigen mechanisme en eindpunt die tezamen vals-negatieve resultaten vrijwel uitsluiten. Uit jarenlange ervaring is gebleken dat met deze aanpak er weinig 'ongelukken' zijn gebeurd. Het risico dat een stof toch *in vivo* genotoxisch blijkt te zijn, bij een batterij *in vitro* testen die volledig negatief is, lijkt zeer gering. Hierdoor is er voldoende vertrouwen in de *in vitro* data en worden ook negatieve resultaten geaccepteerd.

5 Bij een puntmutatie vindt een verandering plaats in de volgorde van de base paren (bijvoorbeeld door vervanging of omwisseling van een base in de DNA streng), chromosoomafwijking betreft de uitwisseling van een groter stuk DNA welke zichtbaar is in de structuur dan wel het aantal chromosomen (waarin het DNA macromolecuul ingepakt voorkomt).

6 De kans dat een stof geen effect laat zien in de *in vitro* testen, maar in werkelijkheid (in de mens) wel een toxicologisch effect kan veroorzaken.

### **Van gevarenidentificatie (*hazard identification*) naar risico-inschatting (*risk assessment*); een voorbeeld uit de reproductietoxicologie**

De bestaande *in vitro* testen zijn ontwikkeld en gevalideerd om een mogelijk embryo-toxische stof te identificeren. Deze 'hazard identification' leidt in de meeste gevallen tot een classificatie, dus een stof heeft wel of niet de potentie om via een bepaald mechanisme reprotoxische te zijn. Of deze toxische effecten ook optreden bij relevante concentraties en blootstellingsroutes is echter de vraag. Recentelijk is onderzocht of met behulp van farmacokinetische modellen het effect van metabolisme en blootstellingsroutes op de reprotoxiciteit van een stof voorspeld kan worden. Hierbij is de concentratie bepaald waarbij in embryonale stamcellen *in vitro* niet goed differentiëren, de zogenaamde EC50.<sup>7</sup> Vervolgens is met behulp van *in silico* modellering een extrapolatie uitgevoerd om, aan de hand van deze *in vitro* concentratie, de toxische dosis *in vivo* te kunnen voorspellen. Voor een aantal stoffen met een verschillend werkingmechanisme bleek op deze manier een goede voorspelling van de effectieve, toxische dosis *in vivo* te kunnen worden gedaan (Verwei et al., 2006). Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of deze aanpak meer generiek kan worden toegepast voor andere *in vitro* testen en eindpunten. *In vitro* testen in combinatie met kinetisch modelleren zullen de onderzekerheden ten aanzien van *in vitro* – *in vivo* extrapolaties reduceren. Deze geïntegreerde manier van testen zal de betrouwbaarheid van *in vitro* data en daarmee het vertrouwen van autoriteiten en industrie in alternatieven vergroten.

### **QSAR en *in vitro* data onder REACH Annex XI**

In Annex XI (Council position June 2006, formally named Annex IX) van REACH dat het gebruik van alternatieve gegevens zal gaan regelen, bestaat een opmerkelijk verschil tussen de eisen die gesteld worden aan QSAR data en aan *in vitro* data. QSAR data mogen in plaats van een *in vivo* test gebruikt worden, onder de voorwaarde dat de wetenschappelijk validiteit is geaccepteerd. Daarbij geeft Annex XI mogelijkheden om een QSAR zowel voor positieve (effect is aanwezig), als voor negatieve (effect is niet aanwezig) uitkomsten te gebruiken.

Wetenschappelijk onderbouwde *in vitro* data mogen daartegen alleen gebruikt worden als ze positief zijn (een effect laten zien); een negatieve uitkomst (geen toxische effecten) moet nog met een *in vivo* test bevestigd worden (m.u.v. hierboven beschreven genotoxiciteit). Immers voor de accepta-

7 De concentratie waarbij 50% van de embryonale cellen zich niet ontwikkeld, in deze test tot een kloppende hartcel.

tie van alle zowel positieve als ook negatieve *in vitro* data ligt de lat een stuk hoger. Dit wordt in de Annex XI geïllustreerd met de volgende eis voor *in vitro* testen vermeld: ‘de wetenschappelijke validiteit moet zijn bewezen door een validatiestudie volgens internationaal overeengekomen validatieprincipes’<sup>8</sup>. Ondanks de grote inspanningen van o.a. ECVAM hebben tot nu toe maar weinig *in vitro* testen deze horde kunnen nemen. Opmerkelijk is echter wel dat een aantal van de huidige QSAR methoden gebaseerd is op data van *in vitro* testen die veelal niet internationaal gevalideerd zijn.

Wij presenteren hier resultaten van een onderzoeksproject voor het gebruik van *in vitro* cytotoxiciteits gegevens om acute toxiciteit van *in vivo* stoffen te voorspellen. Centraal hierbij staat het definiëren van een toepassingsdomein (applicability domain). Dat wil zeggen het expliciet maken van welke chemische structuren wel en welke niet met een bepaalde *in vitro* test getoetst kunnen worden. Chemische domeinen worden al lang toegepast in het veld van methoden gebaseerd op structuurverwantschap (bijvoorbeeld QSARs). Daarbij moet geaccepteerd worden dat bepaalde stoffen buiten het domein vallen en dus niet met deze methode getoetst kunnen worden. Het chemische domein kan gedefinieerd worden op basis van verschillende parameters. Het is mogelijk om fysisch-chemische kenmerken te gebruiken of theoretische, berekende parameters, zoals bepaalde chemische parameters voor de reactiviteit van een verbinding. Verder kan een domein ook afgebakend worden door een specifieke lijst van structuren en substructuren voor een bepaalde *in vitro* test.

En dergelijke inperking, die voor het ontwikkelen van valide QSARs onontkomelijk bleek, wordt echter tot nu toe nauwelijks toegepast in het toxicologische *in vitro* onderzoek. Bij *in vitro* testen wil men evenals bij dierproeven in principe alle stoffen (en zelfs mengsels daarvan) kunnen testen. Toch is de verwachting dat voor een optimaal gebruik van *in vitro* data, vergelijkbaar met de QSAR benadering, het nodig zal zijn een chemisch domein voor de *in vitro* test te definiëren. In een recent OECD document wordt vastgesteld dat de bij de toepassing van QSAR methoden de volgende informatie aanwezig moet zijn voordat de data gebruikt kunnen worden voor regelgeving<sup>9</sup>:

- een gedefinieerd eindpunt,
- een ondubbelzinnig algoritme,

8 “its scientific validity has been established by a validation study, according to international agreed validation principles”

9 The report from the expert group on (quantitative) structure-activity relationships [(Q)SARs] on the principles for the validation of (Q)SARs. OECD series on testing and assessment, number 49. [http://appli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2004\)24](http://appli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2004)24)

- een gedefinieerd domein waarbinnen de test kan worden toegepast,
- gepast parameters voor *goodness-of-fit*, robuustheid en voorspelbaarheid,
- indien mogelijk een mechanistische interpretatie van parameters.

Het Duitse onderzoeksinstituut ZEBET<sup>10</sup> heeft een verzameling van *in vitro* - *in vivo* correlaties gepubliceerd met betrekking tot de voorspelling van de acute toxiciteit voor meer dan 300 stoffen. Daaruit blijkt dat er een redelijke correlatie bestaat tussen *in vitro* cytotoxiciteits data en *in vivo* LD50 data, maar dat de onzekerheid over de voorspellende waarde vrij groot is gezien de hoeveelheid uitschieters. Een dergelijke *in vitro* test heeft dan ook weinig kans om als alternatief voor de bestaande *in vivo* acute toxiciteits testen te worden geaccepteerd.<sup>11</sup> Uitgaande van deze database en literatuurgegevens over de acute toxiciteit in knaagdieren (rat en muis) zijn de mogelijkheden onderzocht om *in vitro* - *in vivo* correlaties te verbeteren door expliciet chemische domeinen te definiëren. Binnen het project is onderzocht of er structureel verwante groepen van stoffen zijn te definiëren, voor welke een meer betrouwbare voorspelling van de acute toxiciteit op basis van *in vitro* gegevens mogelijk is. In figuur 1a wordt de *in vitro*-*in vivo* correlatie ( $r^2 = 0.53$ ) weergegeven voor acute toxiciteit indien de gehele, 'niet beperkte', data set wordt gebruikt. In figuur 1b is een subset van dezelfde gegevens weergegeven. Deze subset omvat het chemische domein dat gedefinieerd kan worden als 'alle stoffen die een carboxylzuur groep hebben'. De correlatie voor deze subgroep chemicaliën is veel hoger ( $r^2 = 0.80$ ) en het aantal uitschieters is afgenomen. Correlatie en voorspellende waarden zijn parameters die bepalend zouden moeten zijn voor acceptatie *in vitro* gegevens door de regelgevende autoriteiten en de industrie.

Naast een goede statistische analyse zou een acceptabele *in vitro*-*in vivo* correlatie ook een mechanistische onderbouwing, of tenminste een redelijke hypothese over het mechanisme moeten hebben die aansluit bij het *in vivo* effect. In het hier gepresenteerde voorbeeld van carboxyl zuren kan een mechanistische hypothese gevormd worden op basis van de niet-specifieke cytotoxiciteit als gevolg van de pH-verandering in de *in vitro* celsystemen. Dit werkingsmechanisme is zeer waarschijnlijk ook bepalend voor de acute toxiciteit *in vivo* van een stof na toediening in de bloedbaan.

10 <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>

11 OECD guideline 420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method: Updated Guideline, adopted 20th December 2001; OECD guideline 425 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure: Updated Guideline, adopted 20th December 2001.

Op dit moment zijn er veel waardevolle *in vitro* systemen beschikbaar. Naast de huidige internationale validatie trajecten is het ook de moeite waard om de mogelijkheden van *in vitro* data voor QSARs te onderzoeken. Het nieuwe REACH voorstel laat in Annex XI veel ruimte om informatie te gebruiken die niet met behulp van dierproeven is verkregen. Echter voor (snelle) acceptatie van zowel *in vitro* methoden als ook QSAR zullen deze alternatieve methoden transparant moeten zijn voor wat betreft hun mechanistische onderbouwing, voorspellende waarde en toepassingsdomein.

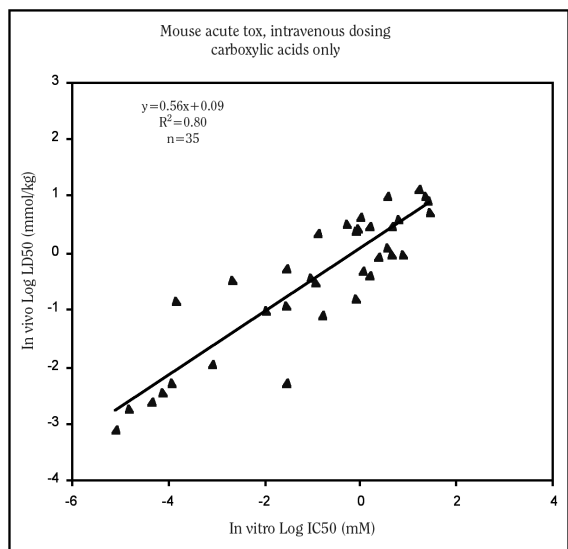
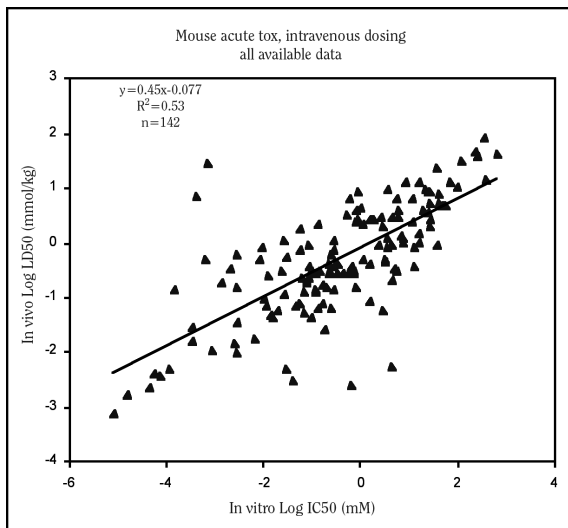
## Conclusies

Nieuwe Europese wetgevingen geven een nieuwe stimulans aan het ontwikkelen en toepassen van alternatieve methoden. Om optimaal gebruik te kunnen maken van alternatieve methoden zal de regulatoire acceptatie van deze methoden versneld moeten worden. Stapsgewijze teststrategieën en integratie van verschillende *in vitro* en *in silico* methodieken (zoals QSAR) zullen hier, naar onze mening, sterk aan bijdragen. Daarnaast liggen grote uitdagingen in nieuwe aanpakken om *in vitro* en QSAR methoden te optimaliseren en te valideren o.a. door methoden in te perken tot bepaalde chemische domeinen. Ook het combineren van verschillende typen data (*weight-of-evidence* aanpak) in de risico-evaluatie van stoffen zal het aantal dierproeven aanzienlijk kunnen reduceren. Hierbij is het van groot belang dat experimenteel onderzoekers en risicobeoordelaars nauw samenwerken in internationale kennisnetwerken om op die manier op een verantwoorde en gedegen wijze een afweging te kunnen maken tussen de bescherming van mens en milieu enerzijds en het gebruik van proefdieren anderzijds.

## Literatuur

- Commission of the European Communities (2003) Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency and amending Directive 1999/45/EC and Regulation (EC) on Persistent Organic Pollutants: Volume II – Annexes I to IX to the Proposal for a Regulation. URL: <http://ecb.jrc.it/REACH>.
- Eskes C. & Zuang V. (2005) Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, A Report Prepared in the Context of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive for Establishing the Timetable for Phasing Out Animal Testing. Edited by Chantra Eskes and Valerie Zuang (2005), ATLA – Alternatives to laboratory animals (33), S1.
- Verwei M., Burgsteden van J.A., Krul C.A.M., van de Sandt J.J.M. & Freidig A.P. (2006) Prediction of *in vivo* embryotoxic effect levels with a combination of *in vitro* and *in silico* techniques. *Toxicology Letters* ; 165: 79-87.
- Halle W. (2003), The registry of cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. ATLA – Alternatives to laboratory animals, 31: 89-198.





**Figuur 1.** Een voorbeeld van de toepassing van een chemisch domein op een dataset voor acute toxiciteit. Figuur 1a (boven) beschrijft een *in vitro*–*in vivo* correlatie voor een dataset van 142 chemicaliën uit de literatuur (The report from the expert group on (quantitative) structure-activity relationships [(Q)SARs] on the principles for the validation of (Q)SARs. OECD series on testing and assessment, number 49).

In figuur 1b (onder) zijn uit de dataset alleen de chemicaliën weergegeven die een carboxylzuurgroep bezitten, dus binnen een bepaald chemische domein vallen. De subset in figuur 1b heeft een veel hogere correlatie en bevat minder uitschieters dan de hele dataset en is daarmee beter geschikt om een voorspelling te doen voor acute toxiciteit *in vivo*.

# VW – de Brusselse paradox

*Pleun Honig*

## **Inleiding**

Een bedrijf dat diergeneesmiddelen ontwikkelt, produceert en verkoopt heeft vanzelfsprekend met dierproeven te maken. De belangrijkste regels voor het registreren, produceren en verhandelen van diergeneesmiddelen zijn vastgelegd in Richtlijn (Directive) 2001/82/EG.<sup>1</sup> Hierin staan de eisen beschreven omtrent uit te voeren onderzoek, de in te dienen dossiergegevens, de te volgen procedures voor vergunningaanvragen, en de kwaliteitsbewaking bij productie, verpakking en opslag. De eisen in deze richtlijn, zijn verder uitgewerkt in de vorm van verordeningen (*regulations*) en richtsnoeren (*guidelines*), waarin eventueel wordt verwezen naar de Europese Farmacopee.<sup>2</sup> Deze uitgewerkte voorschriften zijn gedetailleerder dan in Richtlijn 2001/82/EG zelf. De voorschriften hebben niet allemaal de kracht van wet, maar ze vormen wel de leidraad bij de beoordeling van diergeneesmiddelen.

Naar schatting wordt ongeveer 30% van het jaarlijkse totale aantal dierproeven in Europa gedaan om te voldoen aan de wettelijke eisen voor de registratie en het op de markt brengen van producten, waaronder diergeneesmiddelen.<sup>3</sup> Na de registratie van een product moeten er ook proeven worden uitgevoerd om de kwaliteit te waarborgen van elke partij die van zo'n product op de markt wordt gebracht. Dit vormt een steeds herhaalde bron van dierlijk leed. Van deze verplichte proeven is de manier waarop ze moeten worden uitgevoerd meestal gedetailleerd vastgelegd. Hierop heeft een dierexperimentencommissie (DEC) geen invloed. De proeven moeten worden verricht voor alle landen van de Europese Gemeenschap, thans bestaande uit 25 lidstaten. Landen die hier nauw mee verbonden zijn, zoals Noorwegen, IJsland en Liechtenstein en Zwitserland, hebben vaak dezelfde of een vergelijkbare regelgeving.

- 1 EP and Council Directive 2001/82/EC of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 311, 28.11.2001.
- 2 [http://www.pheur.org/site/page\\_581.php](http://www.pheur.org/site/page_581.php)
- 3 Regulatory Animal Testing, M.J. Schiffelers et al., School of Governance, Utrecht University, [www.bio.uu.nl](http://www.bio.uu.nl), publications, August 2005.

Vanzelfsprekend doet een fabrikant zijn uiterste best om het aantal dierproeven zoveel mogelijk te beperken. Dit is niet alleen prettig voor de proefdieren, maar tevens voor de betrokken medewerkers en uiteindelijk ook voor de bedrijfsresultaten. Men zal proberen om onnodige dierproeven te vermijden, te verfijnen of te vervangen door andere, gelijkwaardige testen, geheel in overeenstemming met de drie V's.

Het vervangen en verfijnen van dierproeven wordt echter bemoeilijkt door verschillende factoren. In de betrokken industrie kost het ontwikkelen en invoeren van alternatieven veel tijd, geld en energie waardoor dit niet altijd de hoogste prioriteit heeft. Aan de andere kant beschikken de betrokken overheden niet altijd over voldoende technische expertise hetgeen leidt tot vertraging bij zowel de beoordeling van de alternatieven als de aanpassing van de regelgeving. Het gaat hierbij overigens niet alleen om hoe de regels worden vastgelegd, maar ook om hoe ze worden geïnterpreteerd.

Ook de vermindering van het aantal dierproeven, die vaak zeker mogelijk is, kan stuk lopen op tegenstand vanuit Brussel. Hetzelfde Brussel dat de Richtlijn 86/609/EEG<sup>4</sup> over de bescherming van proefdieren heeft uitgevaardigd! In het hiernavolgende worden enkele voorbeelden gegeven van hoe de Brusselse regels de drie V's kunnen tegenwerken.

### **Voorbeeld 1: Herhaald basisonderzoek voor productregistratie**

Voor het verkrijgen van een registratie of marktvergunning voor een diergeneesmiddel moet men aan de nationale of Europese overheden (afhankelijk van het soort registratieprocedure) een dossier overleggen waarin alle proeven staan beschreven die met het middel zijn gedaan. Dit betreft proeven met betrekking tot de kwaliteit van het product, de veiligheid voor de diersoort waarvoor het middel bedoeld is, de effecten op mens en milieu, en de werkzaamheid van het middel. Zoals hierboven uiteengezet zijn de onderzoek- en dossiervereisten vastgelegd in Europese regelgeving. Voor diergeneesmiddelen is de regelgeving tot stand gekomen in de jaren tachtig van de vorige eeuw in navolging van vergelijkbare regelgeving voor humane geneesmiddelen. De controle op medicijnen kreeg een bijzonder sterke impuls door het Softenonschandaal. Aanvankelijk waren de eisen nog niet tot in detail vastgelegd maar sinds de jaren tachtig is de regelgeving steeds verder aangepast, gedetailleerd en verfijnd, meegaand met de stand der

4 Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Off. J. Eur. Commun. L 358, 18.12.86.

wetenschap. Zo moeten middelen gescreend worden op ongewenste elementen waarvan het bestaan vroeger niet eens bekend was, zoals op prionen, infectieuze eiwitten die bijvoorbeeld BSE (gekke koeienziekte) kunnen veroorzaken. De meeste aangescherpte kwaliteitseisen zijn natuurlijk volkomen terecht en geen enkele fabrikant zal hier bezwaar tegen hebben.

Wat betreft de eisen voor het basisonderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid ligt dit wat genuanceerder. Voor steeds meer middelen, met name vaccins, wordt een monografie opgesteld in de Europese Farmacopee waarin precies is vastgelegd hoe een werkzaamheids- of veiligheidsproef dient te worden uitgevoerd (aantal dieren, toegediende dosis, observatiecriteria, scoringspercentages, etc.). Opmerkelijk is echter dat veel monografieën zijn geschreven op basis van theoretische kennis en voorafgaand zijn getest op hun toepasbaarheid. Een knelpunt zijn diergeneesmiddelen die al jaren geleden op de markt gebracht op basis van basisproeven die destijds zijn uitgevoerd en die slechts op details afwijken van de huidige vereiste basisproeven. Hoewel zulke middelen hun werkzaamheid en veiligheid inmiddels ruimschoots hebben bewezen in de dagelijkse praktijk, voldoen de uitgevoerde proeven niet meer aan de aangescherpte Europese eisen. Wanneer de bestaande marktvergunning moet worden verlengd of wanneer een vergunning wordt aangevraagd voor een nieuwe markt ontstaan er problemen. Dit is bijvoorbeeld het geval bij de nieuwe lidstaten die recentelijk tot de Europese Unie zijn toegetreden. Zij moeten de Europese regels in hun nationale wetgeving opnemen.

Het is bijvoorbeeld al diverse keren voorgekomen dat een overheid een marktvergunning voor een bestaand product afwees, omdat de (dier)proeven niet volgens de meest recente regels waren uitgevoerd. Zo werd er onlangs geen licentie verleend voor een kattenvaccin dat in andere lidstaten al jaren op de markt was, en evenmin werd een vergunning gegeven voor een reeds lang bestaand pluimveevaccin waar vanuit de beroepsgroep grote vraag naar was. Ondanks de bestaande ervaring eiste men een volledige overeenstemming met de geldende monografie (ook al was die alweer in revisie wegens onuitvoerbaarheid). Deze gang van zaken kwam neer op herhaling van bepaalde basisproeven. Een beroep op de proefdierrichtlijn 86/609 en op de position paper EMEA/ CVMP/140/97<sup>5</sup> waarin duidelijk staat dat autoriteiten geen herhaling van proeven mogen eisen, behalve in gevallen van gegronde twijfel, werd niet gehonoreerd.

5 Position paper EMEA/CVMP/140/97-final of 16 June 1999 on compliance of veterinary vaccines with veterinary vaccine monographs of the European Pharmacopoeia. [www.emea.eu.int](http://www.emea.eu.int)

Men kan zich afvragen wat meer waarde heeft: een eenmalige laboratoriumstudie volgens de nieuwste regels of de gegevens van jarenlang gebruik en geneesmiddelenbewaking (farmacovigilantie). Beoordelen de autoriteiten blijken dikwijls meer aandacht te hebben voor de regeltjes dan voor de wetenschappelijke inhoud van een dossier. Er zijn maar enkele autoriteiten die een beslissing durven te nemen gebaseerd op inzicht en kennis van zaken, in plaats van op de exacte voorschriften. De voorbeelden laten zien dat er behoefte is aan kennis van zaken, pragmatisme, lef en eensgezindheid bij de nationale en Europese overheden die zijn betrokken bij de beoordeling van registratieaanvragen. Als de letter van de wet te strikt wordt gevolgd, zijn de proefdieren (en de fabrikant) het haasje. De DEC staat hier vooralsnog buitenspel.

### **Voorbeeld 2: Tegenwerking bij het accepteren van alternatieve testen**

Alternatieve testen kunnen voordelig uitpakken voor proefdieren. Voordat een alternatieve methode kan worden ingevoerd moet echter een wijzigingsaanvraag worden ingediend, beoordeeld en goedgekeurd. Zo'n wijzigingsaanvraag moet uiteraard aan allerlei regels voldoen. Zo moet de fabrikant de nieuwe methode tegen de oude valideren (aantonen dat de nieuwe methode tenminste net zo betrouwbaar is en vergelijkbare uitslagen levert als de oude test). Het valideren van de methode gaat met de nodige dierproeven gepaard. Maar het doel heiligt de middelen indien de nieuwe test diervriendelijker is en producteigenschappen ook met gebruikmaking van de alternatieve testmethode toch gegarandeerd zijn.

Er ontstaat echter een probleem als de alternatieve testmethode niet door (alle) overheden wordt geaccepteerd. Dat betekent dat de drie V's minder goed worden gerealiseerd. Een ander probleem is dat de verschillende autoriteiten in Europa dikwijls aanvullende nationale eisen stellen aan de documentatie die moet worden ingediend voor een wijziging van een registratie (aantal proeven, soort proeven, etc.). Dit kan gebeuren omdat de betrokken Europese Richtlijn 2001/82 weliswaar voor de hele EU geldt maar niet de status van een wet heeft. Richtlijnen moeten eerst in de nationale wetgeving worden opgenomen wat kan leiden tot verschillen in tekst of interpretatie van de richtlijn in de verschillende landen en verschillen in uitvoering en beoordeling door nationale instanties.

Of een alternatieve testmethode nu op initiatief van de fabrikant wordt aangevraagd of dat zo'n wijziging het gevolg is van een veranderde monografie in de Europese Farmacopee, maakt vaak weinig verschil. Sommige

landen keuren een aanpassing aan de nieuwste versie van de Farmacopee ongezien goed, terwijl andere landen er een zware beoordeling van maken. Wat voor een wijziging het ook betreft, er ontstaat tussen de landen door verschillen in beoordelingstijd en -capaciteit dikwijls ook een verschil in het tijdstip waarop de wijziging mag worden ingevoerd. Dat verschil kan oplopen van enkele maanden tot meerdere jaren!

Zo is er nog steeds niet overal toestemming verleend voor het wijzigen van een werkzaamheidstest voor een varkensvaccin die bestaat uit de vervanging van de opzettelijke infectie van muizen (challenge test met dodelijke afloop voor de niet-gevaccineerde controlegroep) door bloedonderzoek van gevaccineerde muizen. Ook wordt al lang gewacht op goedkeuring voor het wijzigen van een werkzaamheidstest voor een paardenvaccin: het vervangen van een tetanusinfectietest in muizen door een meer proefdier-vriendelijke test. De vervangende testen voor dit vaccin of voor vergelijkbare producten zijn door meerdere EU-landen wel goedgekeurd maar kunnen desondanks nog steeds niet algemeen worden ingevoerd. Producten worden doorgaans geproduceerd en getest voor levering aan meerdere landen tegelijk; één dwarsligger kan de invoering van een diervriendelijke test lange tijd ophouden of zelfs helemaal tegenhouden.

### **Voorbeeld 3: Herhaalde interne testen voor partijvrijgifte**

Voordat een geproduceerde partij van een diergeneesmiddel op de markt mag worden gebracht, dient het eerst met goed gevolg alle door de fabrikant uitgevoerde testen te hebben doorstaan die een kwalitatief goed, veilig en werkzaam product garanderen. Deze tests en de grenzen waarbinnen de testuitslagen moeten liggen, zijn vastgelegd in het registratiedossier. Het is onvermijdelijk in deze bedrijfstak dat deze tests zijn gebaseerd op dierproeven. Dat is met name het geval bij veiligheids- en werkzaamheidstesten.

Onnodig proefdiergebruik doet zich pas voor als zo'n product in Europa wordt ingevoerd vanuit een land waarmee de Europese Unie geen verdrag heeft gesloten over de wederzijdse erkenning van de wederzijdse kwaliteitsregels. Zonder zo'n verdrag dienen de vrijgiftetesten van elke ingevoerde partij in een EU-land te worden gedaan, ook al zijn ze reeds in het exporterende land uitgevoerd. Een herhaling van testen dus. Dit volgt uit EU-Richtlijn 2001/82 art. 55. De bedoeling van deze regel is uiteraard om de Europese markt te beschermen tegen producten die komen uit landen waar men het niet zo nauw neemt met de regels.

In het geval dat hier beschreven wordt, was het exporterende land echter de Verenigde Staten van Amerika waarbij de Amerikaanse productie-locatie een dochteronderneming is van een in Europa gevestigd bedrijf. Deze locatie was door de nationale overheid van Groot-Brittannië goedgekeurd voor productie en testen van diergeneesmiddelen conform de Europese vereisten. Bovendien waren de partijen precies volgens de specificaties van het Europese dossier geproduceerd en getest en werden ze op basis van deze testresultaten door de verantwoordelijke functionaris van de hoofdvestiging in Europa vrijgegeven.

Ook al voldeden locatie, product en tests aan de dossiervereisten, de Europese autoriteiten eisten op straffe van een marktverbod dat alle partijen die afkomstig zijn van deze Amerikaanse locatie, volledig werden hertest binnen de EU. Hoewel de letterlijke tekst van het betreffende artikel (Artikel 55) een ruimere interpretatie toelaat, was men onvermurwbaar: er is geen erkenningsverdrag tussen de EU en de USA, Groot-Brittannië vertegenwoordigt niet de hele EU, en wederzijdse erkenningsverdragen kunnen geen locaties betreffen maar alleen hele landen, en daarmee basta. De fabrikant kon niet anders doen dan alle partijen afkomstig van de betreffende Amerikaanse locatie her te testen voor de EU markt. Een duplicatie van deze testen kon ook niet worden voorkomen door de testen in het land van herkomst achterwege te laten omdat deze producten ook bestemd waren voor de interne Amerikaanse markt. Bovendien mag er volgens de Amerikaanse regels geen ongekeurd product worden geëxporteerd.

Ook hier is de strikte (letterlijke) interpretatie van de Brusselse regelgeving door de Europese autoriteiten de boosdoener, kan beroep op Richtlijn 86/609 niet baten en staat de DEC buitenspel.

#### **Voorbeeld 4: Herhaalde externe testen na partijvrijgifte door de fabrikant**

Stel, een partij van een product is vrijgegeven door de fabrikant op basis van met goed gevolg doorstaan van testen die door de fabrikant binnen de EU zijn uitgevoerd. Het product is verpakt en geëtiketteerd volgens de regels en het is gereed voor levering aan de diverse afnemers in de EU.

Toch is in zo'n geval het gebruik van proefdieren nog niet voorbij wanneer het een immunobiologisch product (vaccin) betreft. Europese autoriteiten kunnen namelijk een door de fabrikant vrijgegeven partij in een overheidslaboratorium nog een keer laten testen. Die mogelijkheid wordt ingegeven door artikel 82 van Richtlijn 2001/82. Dit artikel is echter niet

gebaseerd op noodzaak, maar op geschiedenis. Toen de eerste Europese richtlijn met betrekking tot diergeneesmiddelen in de jaren tachtig van de vorige eeuw van kracht werd,<sup>6</sup> gold deze aanvankelijk alleen voor farmaceutische producten zoals antibiotica, vruchtbaarheidshormonen, pijnstillers, wormmiddelen, etc. Pas via Richtlijn 90/677 werden de vaccins onder de Europese regelgeving geschaard.<sup>7</sup> Toen is ook de clausule opgenomen dat nationale overheden konden aangeven of ze partijen vaccins na vrijgifte door de fabrikant opnieuw wilden laten testen. Die mogelijkheid was een tegemoetkoming aan de lidstaten omdat er van oudsher een soort van wantrouwen tegenover vaccins onder de autoriteiten bestond. De meeste regelgevers en controlerende autoriteiten zijn van huis uit farmaceutisch geschoold en hebben over het algemeen weinig kennis van vaccins. Men is wantrouwig omdat de werkzame stof kan bestaan uit levende (afgezwakte) organismen, omdat de testmethoden dikwijls biologisch zijn en omdat je de eigenschappen van het vaccin daardoor niet in milligrammen of tot drie cijfers achter de komma kunt meten. Enkele nationale overheden hebben daarom destijds aangegeven dat ze vaccins wilden hertesten. Deze overheidskeuring bestond meestal uit een *pro forma* controle van de testuitslagen van de fabrikant, soms uit een herhaalde farmaceutische test en incidenteel uit een diertest. Bovendien waren deze hertesten nooit of zelden gevalideerd met de officiële vrijgiftetesten van de fabrikant. In al die jaren is er door de nationale overheden slechts sporadisch iets gevonden wat aanleiding gaf tot discussie. Er is een keer een betreurenswaardige verontreiniging van een rundervaccin opgetreden die niet werd ontdekt met de door de fabrikant geregistreerde test. Als reactie op deze gebeurtenis is de regelgeving voor het detecteren van verontreinigingen overigens verscherpt.

In die tijd waren nog geen Good Manufacturing Practice (GMP) regels geïmplementeerd. Dat is nu wel het geval en worden er overheidsinspecties uitgevoerd op de productielocaties. De GMP Richtlijn 91/412/EEC stamt uit 1991 en werd van kracht in 1993.<sup>8</sup> Met het GMP systeem staat het hele pro-

6 Council Directive 81/851/EEC of 28 September 1981 on the approximation of the laws of the Member States relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 317, 6.11.81.

7 Council Directive 90/677/EEC of 13 December 1990 extending the scope of Directive 81/851/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to veterinary medicinal products, and laying down additional provisions for immunological veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 373, 31.12.90.

8 Commission Directive 91/412/EEC of 23 July 1991 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice for veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 228, 17.08.91.



ductieproces onder controle, en niet alleen het eindproduct. Desondanks leeft de angst voor vaccins nog steeds bij veel autoriteiten.

Desondanks werd de mogelijkheid tot het hertesten van eindproducten in Europees verband geboden door een wijziging van Richtlijn 2001/82 via Richtlijn 2004/28.<sup>9</sup> Let wel, dit is geen verplichting! Vervolgens hebben de Europese overheden een voorstel ingediend voor het hertesten van door de fabrikant vrijgegeven partijen vaccin: het zogenaamde Official Control Authority Batch Release systeem. Volgens het voorstel moeten van - vrij willekeurig gekozen productgroepen - alle partijen in overheidslaboratoria worden hertest, inclusief de nauw luisterende biologische tests en dierproeven.

De verenigde fabrikanten hebben dit voorstel sterk aangevochten vanwege de willekeur, het dure en ingewikkelde overplaatsen van testen (testtransfers), de twijfels aan de uitslagen van elders uitgevoerde tests, de problemen rond verlengde opslag- en levertijden, de stijgende kosten die moeten worden doorberekend aan de klant en *last but not least*, de zinloze herhaling van dierproeven. De strijd tegen het voorstel van de overheden lijkt in eerste instantie echter verloren. Ondanks dat er ook aan de zijde van welkenkende overheidvertegenwoordigers twijfels bestaan, heeft men in Brussel besloten dat het systeem gaat proefdraaien. De EU-overheid kiest er kennelijk voor om door schade en schande - over de ruggen van de proefdieren - wijs te worden. Het is betreurenswaardig dat DEC's hiertegenover vrijwel machteloos staan.

## **Conclusie**

Voor sommige diergeneesmiddelen worden zeer veel onnodige dierproeven vereist, variërend van de herhaling van basisonderzoek voor de registratie van het product tot een drievoudige herhaling van vrijgiftetests voor elke partij die op de markt wordt gebracht. Dit alles zonder dat het een wezenlijke bijdrage levert aan de kwaliteit, werkzaamheid of veiligheid van die middelen.

Het streven naar Vermindering, Vervanging en Verfijning van dierproeven wordt door Brussel en de lidstaten wel met de mond beleden, maar er wordt kennelijk niet altijd naar gehandeld. Zo hebben de Europese Commissie, de lidstaten en de industrie wel samen een Europees partnerschap

9 EP and Council Directive 2004/28/EC of 31 March 2004, amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 136, 30.4.2004.

gevormd om alternatieven voor dierproeven te bevorderen, o.a. via de 3 Rs verklaring en via een conferentie in Brussel op 7 november 2005. Tegelijk houdt men vast aan een strikte en rechtlijnige interpretatie van de wet. Daarbij verliest men de intentie van die wet soms volledig uit het oog. Indien er meerdere wetten van toepassing zijn, legt de wet op de bescherming van proefdieren meestal het loodje.

Het zou daarom aanbevelenswaardig zijn indien er een Europese harmonisatie of een Europees netwerk van ethische commissies zou ontstaan die op een uniforme manier over dierproeven adviseren. Zo'n adviesorgaan zou ook een stem moeten hebben bij het ontwerpen of wijzigen van de Europese regelgeving met betrekking tot dierproeven. Indien de nadruk komt te liggen op het beoordelen van algemene testprincipes in plaats van op het beoordelen van individuele proefaanvragen, is er een enorme vooruitgang te boeken op het gebied van proefdierbescherming.

# Personalia auteurs

**Drs. Iris Arendzen** heeft diergeneeskunde en bedrijfseconomie gestudeerd en werkt na enkele andere functies binnen de rijksoverheid en het landbouwkundig onderzoek thans bij de Voedsel en Waren Autoriteit waar zij inhoudelijk verantwoordelijk is voor het toezichtsbeleid op gebied van dierenwelzijn waaronder proefdieren. Uit hoofde van haar functie is zij voorzitter van het Platform Alternatieven voor Dierproeven (PAD).

**Dhr. Theo Bakker** is in 1983 bij de stichting van de vakgroep Proefdierkunde in dienst gekomen als documentalist/systeembeheerder. In 1989 werd hij betrokken bij de oprichting en realisatie van het Proefdierkundig Expertisecentrum (PREX). Sinds 2003 is hij werkzaam als informatie specialist/systeem beheerder bij het departement Dier, Wetenschap & Maatschappij.

**Drs. Bob van den Bos** studeerde politieke en sociale wetenschappen. Hij was o.m. lid van de Tweede en Eerste Kamer en het Europees Parlement voor D66. Als parlamentslid was hij betrokken bij de herziening van de Wod. Hij is voorzitter van de Programma Commissie Alternatieven voor Dierproeven van ZonMw.

**Ing. Marjolein van Boxel** is als beleidsmedewerker werkzaam bij het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven in Utrecht. Daarnaast is zij als projectmedewerker betrokken bij EURCA (European Resource Centre for Alternatives in higher education). Zij heeft als projectmedewerker meegewerkt aan het congres 'Genomics & Alternatives to Animal Use', dat in 2004 door het NCA en het Nationaal RegieOrgaan Genomics werd georganiseerd.

**Dr. Sandra Coecke** is gepromoveerd bij de Faculteit Geneeskunde en Farmacie van de Vrije Universiteit Brussel. Ze werkt sinds 17 jaar op het gebied van alternatieven voor dierproeven, met name aan de ontwikkeling van cellen weefselkweektesten die kunnen bijdragen aan vervanging, vermindering

en verfijning van conventionele toxicologische testen, eerst bij Janssens Pharmaceutica (nu J&J) in België en sinds 1996 bij ECVAM in Italië, waar ze hoofd is van de afdeling Strategic Developments. In het bijzonder is zij werkzaam op het gebied van metabolisme en neurotoxicologie.

**Dr. Greetje Elaut** behaalde na haar studies apotheker onlangs de titel van doctor in de Farmaceutische Wetenschappen aan de Vrije Universiteit Brussel, Brussel, België. Als doctorandus was zij verbonden aan de dienst Toxicologie, Dermato-Cosmetologie en Farmacognosie, onder leiding van Prof. Dr. Vera Rogiers. Ze verrichtte onderzoek naar de metabole en toxicologische eigenschappen van hydroxaamzuur-bevattende histon deacetylase inhibitoren aan de hand van korte-termijn culturen van primaire hepatocyten. Greetje Elaut is eerste auteur van acht artikelen en co-auteur van dertien publicaties in internationale tijdschriften met peer-review. Ze is eveneens eerste auteur van twee, en co-auteur van vier hoofdstukken in boeken.

**Dr. Andreas P. Freidig** heeft na een studie aan de Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) in Zürich, aan de Universiteit Utrecht een promotieonderzoek bij het Research Institute of Toxicology (nu IRAS) uitgevoerd. Hij is geregistreerd Toxicoloog en werkzaam bij TNO Kwaliteit van Leven als onderzoeksleider en product manager in de business unit Biosciences.

**Prof. dr. Geny Groothuis** studeerde biochemie in Groningen. Ze is hoogleraar Geneesmiddel Metabolisme en Toxicologie van de afdeling Farmacie van de RUG. Ze houdt zich met haar groep o.a. bezig met het ontwikkelen van in vitro technieken om geneesmiddelmetabolisme en toxiciteit bij de mens te voorspellen, en om daarmee een bijdrage aan de 3 V's te leveren. Ze is lid van de Programmacommissie Alternatieven voor Dierproeven van ZON/Mw en van de DEC van de RUG. Zij heeft in 1998 de Hugo van Poelgeestprijs voor Alternatieven voor dierproeven ontvangen.

**Dr. Ineke Gubbels** is afgestudeerd aan het conservatorium (piano). Vervolgens heeft zij Voeding en Toxicologie gestudeerd. In haar werk als sectiehoofd Regulatory Affairs bij NOTOX BV was zij verantwoordelijk voor registraties en notificaties van nieuwe en bestaande industriële chemicaliën binnen de EU en daarbuiten (VS en OECD). Daarnaast heeft ze zich beziggehouden met onderzoek naar de mogelijkheden van intelligente teststrategieën en geïntegreerde testmethoden die het gebruik van proefdieren dras-

tisch zouden kunnen verminderen. Op dit moment werkt zij als Regulatory Consultant en REACH Manager bij Ciba Expert Services waarbij implementatie en strategische adviezen op het gebied van REACH (de nieuwe Europese Chemicaliënwetgeving) centraal staan.

**Dr. Thomas Hartung** is hoofd van ECVAM sinds 2002. Hij is al jaren actief op het gebied van alternatieven voor dierproeven en heeft veel ervaring in de ontwikkeling van *in vitro* modellen voor het testen van de werking en de toxiciteit van geneesmiddelen. Verder is hij vice-president van de Middle-European Society for Alternatives to Animal Experiments. Hij heeft verscheidene nationale en internationale prijzen gekregen voor zijn werk aan *in vitro* methoden ter vervanging van dierexperimenten.

**Prof. dr. Coenraad Hendriksen** is als proefdierdeskundige en onderzoeker Verbonden aan het Nederlands Vaccin Instituut in Bilthoven. Zijn onderzoeksaandacht ligt vooral op de ontwikkeling van 3 V methoden binnen de kwaliteitscontrole van vaccins. Daarnaast is hij parttime hoogleraar alternatieven voor dierproeven aan de Faculteit voor Diergeneeskunde in Utrecht en hoofd van het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA) aan de Universiteit Utrecht.

**Drs. E. Honig (Pleun)** studeerde diergeneeskunde in Utrecht (1970-1977). Zij werkte ruim 10 jaar als practicus in Rotterdam, alvorens de overstap te maken naar de farmaceutische industrie. Sindsdien is zij de contactpersoon tussen het bedrijf en de Europese overheden voor de toelating van diergeneesmiddelen. In die functie is zij nauw betrokken bij regelgeving omtrent dierproeven.

**Dr. Jean Horbach** studeerde biochemie aan de Rijksuniversiteit Leiden en promoveerde aan de Universiteit Maastricht. Sinds 1988 werkt hij reeds aan de ontwikkeling van *in vitro* systemen voor de voorspelling van toxiciteit. Momenteel is hij hoofd van de sectie DMPK & Safety van de afdeling Farmacologie bij N.V. Organon. Als zodanig is hij betrokken bij het opzetten en toepassen van *in vitro* screens voor het in kaart brengen van metabolisme en toxiciteit van nieuwe verbindingen vóór de start van het standaard preklinische traject.

**Dr. Cyrille A.M. Krul** studeerde Gezondheidswetenschappen aan de Universiteit Maastricht. Ze promoveerde aan de Universiteit Utrecht op een onderzoek m.b.t. de toepassing van een dynamisch *in vitro* maagdarmmodel in relatie tot voedselveiligheid. Ze is geregistreerd toxicoloog en werkzaam bij TNO Kwaliteit van Leven (Zeist) als product manager Genetische en In vitro Toxicologie. Daarnaast is ze lid van de DEC-TNO, expertise 'Alternatieven'.

**Prof. dr. René Remie** studeerde Farmacie aan de Universiteit van Groningen, specialiseerde tot farmacoloog. Hij is sinds 1989 in dienst van Solvay Pharmaceuticals en momenteel daar werkzaam als proefdierdeskundige. Hij is voorzitter van de Stichting Microsurgical Developments (MD) en medeoprichter en (ex)voorzitter van de Stichting Dec Consult. Sinds 1997 is hij hoogleraar microchirurgie en experimentele technieken bij proefdieren bij de Rijksuniversiteit Groningen, afdeling Biomonitoring & Sensoring. Hij participeert in opleidingen in Nederland voor onderzoekers ex Art. 9 van de Wod en FELASA Cat. C-cursussen. Hij is CEO van 3-R's E&C B.V. en wetenschappelijk directeur van International Microsurgical Training Centre B.V. in Lelystad.

**Dr. Lars Ridder** is aan de Wageningen Universiteit gepromoveerd op computer simulaties van enzym reacties. Na een postdoc positie aan de universiteit van Bristol (Engeland), werkt hij sinds 2002 bij Organon aan het ontwikkelen en beschikbaar maken van *in silico* methoden voor het voorspellen van ADME/Tox eigenschappen van potentiële geneesmiddelen.

**Dr. J.J.M. (Han) van de Sandt** is geregistreerd toxicoloog, gepromoveerd aan de Universiteit Utrecht. Hij leidde binnen TNO Kwaliteit van Leven een onderzoeksgroep op het gebied van in vitro kinetiek en toxicologie en was lid van DEC-TNO en DEC-Consult. Nu is hij Manager Research (chemische veiligheid) en leidt hij het onderzoeksprogramma 'Gevaarlijke Stoffen en Arbeidsveiligheid'.

**Dr. Willem Schoonen** studeerde biologie (1977-1983; cum laude) aan de Rijksuniversiteit Utrecht en is aldaar gepromoveerd op een onderzoek aan steroid feromonen. Na een 2-jarige post-doc baan aan de VU, is hij sinds 1990 tot op heden werkzaam bij het farmaceutisch bedrijf, N.V. Organon. Tot het jaar 2000 werd *in vitro* onderzoek verricht naar de klassieke steroid

en G-eiwit gekoppelde membraan receptoren voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen voor anticeptie, antidepressie en hormonale replacement therapie. Vanaf medio 2000 houdt hij zich bezig met toxicologie, waarbij het opzetten en uitvoeren van *in vitro* screeningsmethodes alsmede het implementeren van toxicogenomics de basis vormen.

**Dr. Cees Smit** studeerde bedrijfseconomie aan de Vrije Universiteit te Amsterdam. In 2003 is hem een eredoctoraat verleend door de Universiteit van Amsterdam voor zijn werk op het terrein van belangenbehartiging voor patiënten. Hij is bestuurlid van de VSOP, alliantie voor erfelijkheidsvraagstukken ([www.vsop.nl](http://www.vsop.nl)). De VSOP is – tezamen met de NVP en de FNMWV – medeoprichter van de Stichting Informatie Dierproeven ([www.informatiedierproeven.nl](http://www.informatiedierproeven.nl)).

**Dr. Frans Stafleu** studeerde in 1982 als dierenarts af en werkte aanvankelijk in een dierenartspraktijk. Vervolgens kwam hij in dienst voor het Gemeenschappelijk Dieren Instituut Amsterdam van de Universiteit van Amsterdam waar hij zich o.a. richtte op het gebruik van dierproeven in het geneesmiddelen- en kankeronderzoek. Van 1989 tot 1993 was hij voor zijn promotieonderzoek werkzaam bij het Centrum voor Bio-ethiek en Gezondheidsrecht van de Universiteit Utrecht en gedetacheerd bij de Vakgroep Proefdierkunde van de Universiteit Utrecht. Zijn promotieonderzoek handelde over de ethische toelaatbaarheid van dierproeven zoals die door onderzoekers wordt beoordeeld. Momenteel is hij in deeltijd als universitair docent werkzaam bij het Ethiek Instituut van de Universiteit van Utrecht.

**Dr. Jac. A.A. (Sjaak) Swart** studeerde biologie en filosofie en rondde in 1991 een promotie af over drug-receptor interacties. Sinds 1990 is hij werkzaam bij de Science & Society Group van de Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen van de Rijksuniversiteit Groningen. Hij publiceerde onder andere over dierproeven, wilde dieren en natuurvisies en is lid van de DEC van de RUG en lid van het bestuur van de NVDEC.

**Dr. Jan van der Valk**, opgeleid als medisch-bioloog, werkt sinds 1994 bij het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven. Zijn aandachtspunten zijn alternatieven in het onderwijs, menselijk weefsel als alternatief, en het vervagen van foetaal kalfserum in *in vitro* kweken. Daarnaast neemt hij o.a. deel aan twee dierexperimentencommissies.

**Dr. Jan Vorstenbosch** is universitair docent Toegepaste Ethiek bij de sub-faculteit Wijsbegeerte van de Universiteit van Utrecht en senior onderzoeker aan het Ethiek Instituut van dezelfde universiteit. In 1990 promoveerde hij op een proefschrift over *Informed Consent*. Sinds ruim 15 jaar is de dierethiek een van zijn belangrijkste aandachtsgebieden in de ethiek. Hij publiceerde o.a. over DEC's, over alternatieven en over genetische modificatie bij dieren.

**Drs. F.P. Wassenberg** studeerde biologie aan de Universiteit van Utrecht. Hij schreef dit stuk als beleidsmedewerker van de vereniging Proefdiervrij, waar hij van 2000 tot 2006 als beleidsmedewerker werkte. Tegenwoordig werkt hij als beleidsmedewerker Proefdieren voor de Sophia-vereniging tot Bescherming van Dieren in Amsterdam.

**Drs. Gerrit-Jan Wennink** is plaatsvervangend hoofd van de afdeling Toxicology & Drug Disposition bij N.V. Organon. Daarnaast is hij als proefdierdeskundige werkzaam bij voornoemde firma. Zijn speciale belangstelling gaat uit naar de toepassing van alternatieven in het geneesmiddelenonderzoek. Hij is nauw betrokken bij de beleidsvorming van Organon met betrekking tot dierexperimenteel onderzoek en de ontwikkeling van alternatieven.