



Netherlands   
**Toxicogenomics** | CENTRE

Meer kennis

Betere testen

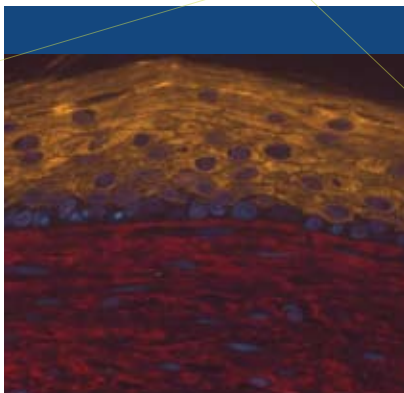
Minder dierproeven

# Meer kennis, betere testen, minder dierproeven

Het streven naar minder dierproeven wordt breed gesteund in de maatschappij. Zeker als het gaat om het bepalen van de veiligheid van chemische verbindingen voor toepassing in bijvoorbeeld voeding, cosmetica of schoonmaakmiddelen is het gebruik van dierproeven omstreden. Naast ethische bezwaren spelen in toenemende mate ook economische en technisch-inhoudelijke overwegingen hierbij een rol.

Dierproeven zijn namelijk tijdrovend en arbeidsintensief, wat ze zeer kostbaar maakt. Bovendien is de voorspellende waarde van een dierproef op z'n zachtst gezegd twijfelachtig. Het blijkt keer op keer lastig om op basis van een effect in bijvoorbeeld een muis of een rat te voorspellen wat het effect zal zijn in de mens. Het grote aantal kandidaat-geneesmiddelen dat ondanks een uitgebreid traject van dierproeven, toch niet de patiënt haalt vanwege het risico op schadelijke effecten in de mens getuigt hiervan.

Tot slot spelen de veranderingen in wet- en regelgeving binnen de EU een grote rol. Het verbod op dierproeven voor cosmetische producten en de veiligheidseisen voor industriële chemicaliën die voortvloeien uit het REACH programma creëren een nieuwe situatie voor bedrijven die actief zijn op de Europese markt. Vanuit de farmaceutische, chemische en cosmetische industrie is er daarom veel belangstelling voor nieuwe testmethoden die betere resultaten leveren en geen gebruik maken van proefdieren.



## Allergische reacties testen op menselijke huid

Om te testen of een stof irriterend of bijtend is kan inmiddels gebruik worden gemaakt van een proefdiervrije methode, namelijk een testmodel dat gebaseerd is op menselijke huidcellen, afkomstig van huid die overblijft na cosmetische chirurgie. Dit huidmodel vervangt de praktijk waarin stoffen toegediend werden in het oog of op de huid van levende konijnen. Een belangrijke verbetering en bovendien blijkt dit huidmodel ook een veel betere voorspelling te leveren dan de oude dierproeven. Echter, voor het testen op mogelijke allergische reacties op de huid is nog geen alternatief beschikbaar.

Deze test vindt nog steeds plaats door de stof aan te brengen op het oor van levende muizen. Maar een NTC-project dat wordt uitgevoerd door onderzoekers van het Leids Universitair Medisch Centrum kan hier verandering in brengen. De onderzoekers gebruiken het huidmodel om in kaart te brengen wat er precies gebeurt bij het allereerste contact tussen een allergeen (het molecuul dat een allergische reactie opwekt) en de huidcel. Ze hopen op deze manier een zogeheten biomarker te vinden voor het optreden van een allergische reactie. Bijvoorbeeld een bepaald eiwit dat altijd vrijkomt als er een allergeen in aanraking komt met de huid.

Deze biomarker kan dan de basis vormen van een nieuwe test, waarin gebruik wordt gemaakt van het huidmodel in plaats van levende proefdieren. Inmiddels zijn de onderzoekers erin geslaagd om op moleculair niveau de processen te ontfaan die in de huid het onderscheid maken tussen allergenen en irriterende/bijtende stoffen. Dit is een belangrijke doorbraak en de onderzoekers zijn optimistisch over het ontwikkelen van een test voor allergische reacties op basis van het huidmodel.

# Toxiciteit anders benaderen

De grote behoefte aan betere, proefdiervrije testmethoden komt perfect samen met de fundamentele verschuiving in ons begrip van toxiciteit en de manier waarop we toxische processen bestuderen. Dankzij de opkomst van nieuwe technieken waarmee we op grote schaal genetische en moleculaire processen in kaart kunnen brengen – de zogeheten 'omics'-technologieën – verkrijgen we geheel nieuwe inzichten in het hoe en waarom van toxische effecten.

Toxiciteit is een complex biologisch fenomeen, waarin vele factoren een rol spelen. Het toepassen van 'omics'-technologieën in toxicologisch onderzoek biedt uitstekende mogelijkheden om dit complexe netwerk van factoren te ontrafelen en deze kennis vervolgens in te zetten om testmethoden te ontwikkelen die gebaseerd zijn op een grondig begrip van het biologische proces in de mens.

Deze toxicogenomics-benadering vormt de strategie van het Netherlands Toxicogenomics Centre (NTC); vanuit een fundamenteel begrip van toxiciteit betrouwbare, efficiënte en proefdiervrije testmethoden voor het bepalen van chemische veiligheid ontwikkelen, die bijdragen aan een betere inschatting van gezondheidsrisico's voor de mens.

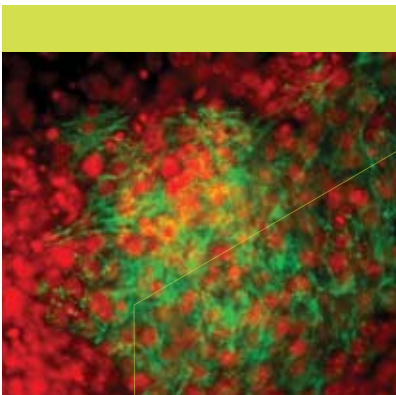
## Hartspiercellen in een schaalpje

Het testen op reproductieve toxiciteit ('reprotox') vergt veruit de meeste proefdieren van alle klassen van toxiciteitstesten. Bij deze testen gaat het om het bepalen van de risico's op schadelijke effecten op de vruchtbaarheid en/of de ongeboren vrucht. Hiertoe worden drachtige proefdieren, meestal ratten, blootgesteld aan de nieuwe stof. Deze studie opzet vergt twee generaties: de ouders (vrouwtjes en mannetjes) en nieuwgeborenen.

In sommige gevallen moet ook het effect op de vruchtbaarheid van deze nieuwe generatie worden getest, waardoor er nog een generatie dieren nodig is voor de proef. Het zal duidelijk zijn dat dergelijke 'generatiestudies' enorme hoeveelheden dieren vragen. Voor het Europese veiligheidsprogramma REACH is de schatting dat er 9 miljoen proefdieren nodig zijn, waarvan maar liefst tweederde wordt gebruikt voor reprotox testen. Iedere mogelijkheid voor een alternatieve reprotox test heeft daarmee meteen een grote impact op het aantal proefdieren.

Bij het RIVM wordt, in het kader van het NTC programma, gewerkt aan een test die gebruik maakt van embryonale stamcellen van muizen om het effect van een stof op de ontwikkeling van het hart te evalueren. Het gaat hier om een zogeheten continue cellijn: ingevroren cellen die doorlopend gekweekt kunnen worden. Embryonale stamcellen kunnen zich nog ontwikkelen tot ieder type cel in het lichaam en bootsen dus heel goed de ontwikkeling van een levend embryo/foetus gedurende de zwangerschap na. Deze cellen kunnen bijvoorbeeld in tien dagen worden gekweekt tot kloppende hartspiercellen. Door de nieuwe stof toe te voegen aan de celkweek wordt duidelijk of en welke effecten de stof heeft op de ontwikkeling van de hartspier. Bovendien worden genexpressie-profielen bepaald gedurende de kweekperiode om vast te stellen welke genen worden beïnvloed door de nieuwe stof.

Dit levert belangrijke informatie over de oorzaken van schadelijke effecten van stoffen en het biedt aanknopingspunten voor het opstellen van expressiepatronen die specifiek zijn voor die stof of een klasse van stoffen. Inmiddels is voor een aantal groepen van genen aangetoond dat de expressie samenhangt met de effecten van stoffen. Deze patronen kunnen vervolgens worden gebruikt om van andere onbekende stoffen te voorspellen of er schadelijke effecten te verwachten zijn, zonder dat er meteen een dierproef aan te pas moet komen.



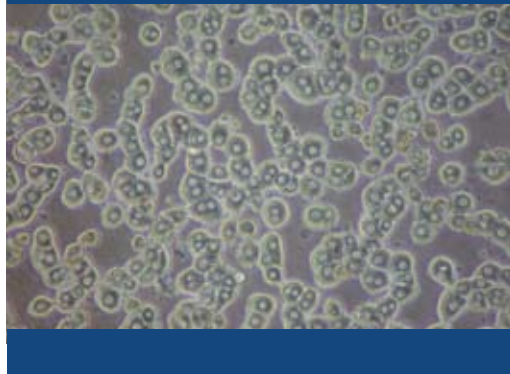
Kloppende hartspiercellen zie [www.toxicogenomics.nl](http://www.toxicogenomics.nl)

## Netherlands Toxicogenomics Centre: Alle belangrijke spelers in één consortium

In het Netherlands Toxicogenomics Centre (NTC), gestart in 2004, werken alle toonaangevende Nederlandse organisaties op het gebied van toxicogenomics samen: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk onderzoek (TNO), Universiteit Leiden, Leids Universitair Medisch Centrum, Wageningen Universiteit, Erasmus Medisch Centrum en Universiteit Maastricht (coördinator). Daarnaast participeren ook 12 bedrijven in het NTC, waaronder Unilever, Merck, BioDetection Systems, DNAge en Vitromics.

De deelnemende bedrijven produceren voor eindgebruikers (geneesmiddelen, huishoudelijke en industriële chemicaliën, cosmetische producten), ontwikkelen apparatuur en detectie-systemen of voeren veiligheidsstudies uit voor derden. In het onderzoeksprogramma van het NTC staan vier soorten toxiciteit centraal die stuk voor stuk van groot belang zijn voor de volksgezondheid, namelijk carcinogeniteit (kankerverwekkendheid), reproductieve toxiciteit (effecten op vruchtbaarheid, foetus of hormoonhuishouding), immunotoxiciteit (immuunsysteem) en orgaan toxiciteit (specifiek lever en nieren).

Het NTC wordt gefinancierd uit de middelen van het Netherlands Genomics Initiative en Technologiestichting STW, en heeft in 2008 vervolg financiering ontvangen voor de periode 2008-2013.



## Levercellen als voorspeller van genetische schade

Om te testen of een stof carcinogeen (kankerverwekkend) is wordt eerst gekeken of de stof in cellen van bacteriën en van zoogdieren (in vitro) leidt tot schadelijke veranderingen in het genetisch materiaal van de cel. Bij een positieve uitslag (d.w.z. er treden veranderingen op) worden vervolgens levende knaagdieren ingespoten met de stof - de zogeheten in vivo genotox-test.

Een belangrijk probleem is dat de in vitro testen die bepalen of de in vivo genotox-test noodzakelijk is veel vals positieve resultaten produceren. Dit leidt vervolgens tot veel onnodige experimenten met levende knaagdieren. Een NTC project dat wordt uitgevoerd door de Universiteit Maastricht heeft een testmethode ontwikkeld waarbij levercellen, van zowel mens als muis, de basis vormen. De onderzoekers hebben verschillende 'klassen' van bekende genotoxische stoffen losgelaten op deze levercellen om zogeheten genexpressieprofielen te bepalen. Simpel gezegd; ze hebben gekeken welke genen door de stof 'aan' of 'uit' worden gezet. Vervolgens hebben ze wiskundige modellen opgesteld, waarmee op basis van de genexpressieprofielen voorspeld kan worden of een stof zal leiden tot genetische veranderingen. De resultaten zijn veelbelovend, in een set van 32 stoffen wisten ze maar liefst van 90% de effecten correct te voorspellen; dat betekent beduidend minder vals positieven.

Als eerste toepassing voorzien de onderzoekers een combinatie van de klassieke in vitro testen voor genetische schade met deze nieuwe genexpressie-test om daarmee het aantal vals positieve resultaten, en daarmee het aantal onnodige dierproeven, flink terug te schroeven. In de toekomst kan deze testmethode mogelijk de genotox-dierproeven volledig vervangen. De onderzoekers zullen op korte termijn hun resultaten voorleggen aan ECVAM, de Europese organisatie voor de validatie van alternatieven voor dierproeven. Dit zal hopelijk leiden tot grootschalige Europese studies om de nieuwe test in de praktijk te valideren.

# Wetenschappelijk succes is niet genoeg; politieke actie is essentieel

De ontwikkeling van nieuwe testmethoden begint bij wetenschappelijk onderzoek. De resultaten van het NTC laten zien dat de wetenschap in staat is alternatieve methoden te leveren. Meer en meer alternatieven voor dierproeven komen binnen handbereik. Echter, dat is slechts het begin van het traject.

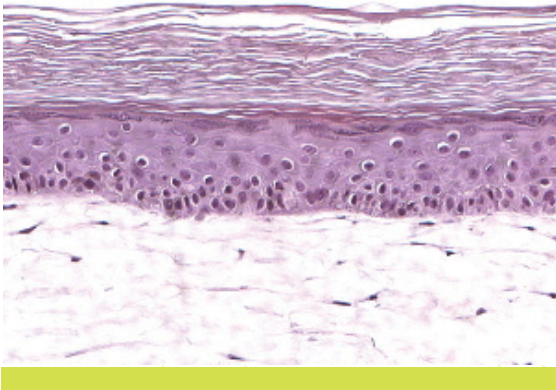
Een nieuwe test ontwikkelen is één ding, ervoor zorgen dat die test ook breed gebruikt kan en mag worden is iets heel anders. In dit proces spelen nationale en Europese goedkeuringsinstanties, die bepalen of nieuwe geneesmiddelen of chemische verbindingen op de markt toegelaten worden, een sleutelrol. Het beleid dat deze instanties uitvoeren biedt weinig tot geen ruimte om af te wijken van het standaardprotocol, waarin dierproeven een haast onaantastbare positie hebben verworven.

Een nieuwe, dierproefvrije, test zal daarom alleen geaccepteerd worden na een uitvoerig proces van validatie waarin deze zijn betrouwbaarheid onomstotelijk heeft bewezen. Dit vormt een groot obstakel. Het validatieproces is namelijk tijdrovend, ingewikkeld en kostbaar, en daarnaast onaantrekkelijk voor wetenschappers omdat het geen uitzicht biedt op aansprekende nieuwe bevindingen. Dat er bovendien nauwelijks financieringsmogelijkheden zijn voor validatiestudies maakt het probleem alleen maar groter. Willen we de investeringen in het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven ten volle benutten, dan moeten deze twee hindernissen – moeizame validatie en conservatief beleid – worden aangepakt.

Maar daarvoor is politieke actie nodig. Inhoud van beleid en prioriteiten in onderzoeksfinitanciering zijn immers het resultaat van politieke keuzes. Er is volop ruimte voor verandering en verbetering in de ontwikkeling en implementatie van alternatieven voor dierproeven, mits de politiek bereid is bestaande conventies te doorbreken.

## Wat kan de Nederlandse politiek concreet doen?

- Via de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport zorgen dat het onderwerp op de juiste Europese agenda's komt.
- Via de Nederlandse leden van het Europees Parlement zorgen voor aanpassing van het beleid van de relevante Europese goedkeuringsinstanties en voor meer middelen voor validatiestudies.
- Via de minister van Onderwijs, Cultuur en Wetenschap invloed uitoefenen op de verschillende Europese financieringsprogramma's voor wetenschappelijk onderzoek en ook hier meer aandacht geven aan validatiestudies.
- Op nationaal niveau zorgen voor duurzame investeringen in het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven en erop toezien dat ook het Nederlandse bedrijfsleven en de regelgevers hierbij worden betrokken.
- Op alle fronten bevorderen dat Nederland bij de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven een voortrekkers rol kan (blijven) vervullen.



## Meer informatie

Netherlands Toxicogenomics Centre  
Prof.dr. Jos Kleinjans  
wetenschappelijk directeur

T : 043 388 1096

E : [j.kleinjans@grat.unimaas.nl](mailto:j.kleinjans@grat.unimaas.nl)

I : [www.toxicogenomics.nl](http://www.toxicogenomics.nl)