



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Het aantal patiënten met metabole dysfunctie neemt toe. Deze patiënten krijgen vaak te maken met metabole complicaties waaronder het dysfunctioneren van de darm, de nier en de lever.

Darm, nier en lever spelen een hele belangrijke rol bij zowel absorptie van stoffen (met name het maag-darm kanaal), als bij de metabolisatie (lever en darm) en excretie van stoffen (nier, lever). Begrip van de kinetiek en interactie van stoffen in een (dys)functionerend orgaan kan in klinische setting gebruikt worden om dosering aan te passen voor specifieke omstandigheden in de patiënt (met verstoorde nier/lever/darm functie). Daarnaast kunnen bepaalde bijwerkingen die bijvoorbeeld veroorzaakt worden door drug-drug interactie voorkomen worden. Om dit te kunnen bepalen is het nodig om gebruik te maken van goede voorspelbare en translationele methode. **Wij willen ex vivo de functie en farmacokinetiek van stoffen bestuderen in darm, lever en nier. Deze ex vivo modellen kunnen dan gebruikt worden om kinetiek en metabolisme van medicijnen en nutriënten in ziekte en gezondheid te bestuderen, denk hierbij aan, o.a (verstoorde) klaring door de lever of nier en opname in de darm.** Het doel is om deze methode op te zetten in dierlijk materiaal maar om uiteindelijk over te gaan op humaan materiaal (zoals afgekeurde donor organen of materiaal dat beschikbaar komt na operatie). Het uiteindelijke doel is, door gebruik te maken van translationele modellen, en uiteindelijk ook humaan materiaal, de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en therapeutica sneller te laten plaatsvinden en beschikbaarheid op de markt te versnellen.

Darm: Voor de darm studies willen we gebruik maken van een al bestaand systeem nl het InTESTine™ platform. Dit is een medium throughput platform, wat betekent dat we met 1 stuk darmweefsel meer dan 96 condities kunnen testen. Afhankelijk van de vraagstelling kan gebruik gemaakt worden van slachthuisafval of dieren die voor een ander doeleinde zijn gedood. Het is echter in sommige gevallen (bijvoorbeeld wanneer intacte mucosa nodig is) wenselijk om vers darmweefsel te gebruiken.

Lever en nier: We willen voor de lever en nier ook een ex vivo model opzetten om meer informatie te krijgen over hoe deze organen met triggers van buitenaf, zoals nutrienten, bacteriën of farmaca, omgaan en op welke manier ze een rol spelen in de farmacokinetiek van een bepaalde stof in ziekte en gezondheid. Farmacokinetische studies met bekende drugs zullen in dit model worden getest en vergeleken met bekende in vivo data. Als het model goed voorspellend is voor de in vivo situatie zullen het model gebruikt worden om nieuwe drugs te testen. Deze kennis zal bijdragen aan het verbeteren en versnellen van klinische studies en kan leiden tot een versnelde beschikbaarheid voor de patiënt. Ook kan men informatie verkrijgen over drug-drug interactie in organen waarin de functie verstoord is. Vooral voor de nier is er een gebrek aan goede functionele en voorspellende markers, met name vanwege de complexiteit van dit orgaan. In de kliniek is het vaak een probleem dat nierfalen pas wordt gediagnosticeerd op het moment dat patiënt zich al in een vergevorderd stadium bevindt. Daarom willen we onderzoeken of microdosering van (radioactief) gelabelde stoffen gebruikt kan worden om de lever en nier functie op een betrouwbare en veilige manier te meten en of we deze methode kunnen gebruiken om mogelijk nieuwe markers te identificeren. In het verleden is al aangetoond dat microtracing voor de darm een veilige en betrouwbare methode is.

In de voorgestelde ex vivo setup kan men heel gericht in 1 geïsoleerd orgaan naar de functie en/of farmacokinetiek van een bepaalde stof kijken.

Om de functie en de manier waarop een orgaan omgaat met stoffen goed te kunnen bestuderen is het noodzakelijk om vers/levend weefsel te gebruiken. Dit kan afkomstig zijn van slachtafval, van dieren die voor een ander doel zijn gedood maar waarvan deze organen beschikbaar zijn, van dieren die (eventueel voorbehandeld) voor een specifieke vraagstelling zijn gedood of humaan materiaal (zoals afgekeurde transplantatie organen of restmateriaal na operatie). Dit wordt verder besproken in 3.4

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van het onderzoek is het bestuderen van functie, kinetiek en metabolisme van stoffen in een geïsoleerd orgaan. Het gaat hierbij specifiek om first-pass organen zoals darm, lever en nier. Dit zal in preklinische setting plaatsvinden om de methode op te zetten en te valideren. Het achterliggende doel is om de verworven kennis uiteindelijk toe te passen op humaan materiaal.

Voor de darm is al methodologische ervaring met het ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek in dierlijk materiaal.

De volgende vragen zullen o.a. beantwoord worden:

Darm:

- Wat zijn de verschillen in regionale absorptie (duodenum, jejunum, ileum, colon) van stoffen, en wat is het verschil tussen species (varken versus humaan – voor de vertaalslag heel belangrijk)? Dit helpt te bepalen in hoeverre resultaten 1:1 vertaald kunnen worden naar de mens en waar aanvullende informatie vereist is.
- Welke invloed hebben externe factoren (omgeving, stress, behandeling, ziekte, ontsteking) op de darmdoorlaatbaarheid van stoffen en hoe kunnen we die moduleren.

Voor de lever en nier zal eerst de ex vivo meet methode opgezet moeten worden. Dit is het eerste doel van deze aanvraag. Het tweede doel van deze aanvraag is om in deze ex vivo modellen de farmacokinetiek van stoffen te bestuderen in gezondheid en ziekte.

Doelstellingen voor het opzetten van de meet methode zijn oa:

- Lever en nier minimaal 4 uur stabiel laten functioneren ex vivo. Uit literatuur is bepaald dat dit de minimale tijd is die nodig is om een experiment uit te voeren waarin zowel functie als klaring van een stof kan worden bestudeerd.
- Ex vivo induceren van schade aan het orgaan zodat farmacokinetiek ook in ziek orgaan kan worden bestudeerd. Dit zal niet voor chronische schade mogelijk zijn maar wel voor acute schade.
- Identificeren van functionele en voorspellende markers voor ex vivo functie en correleren aan humane data
- Meten van farmacokinetiek van referentie stof en uitkomst vergelijken met in vivo data uit humane data sets of literatuur.

Doelstellingen voor het tweede deel zijn:

- Meten van farmacokinetiek (bijvoorbeeld drug-drug interactie) van bekende en onbekende stoffen in preklinische setup .
- Testen van functionele markers in ex vivo setup in gezonde en zieke organen.

Dit project heeft een hoge haalbaarheid doordat de betrokken onderzoeksgroepen veel expertise hebben op het gebied van farmacokinetiek en metabole ziekten. De onderzoeksgroepen hebben een brede expertise op het gebied van voorspellen en moduleren van kinetiek van oa voedingsstoffen en medicijnen in gezondheid en ziekte. De onderzoeksgroep bestaat uit onderzoekers met ruime ervaring in het bestuderen van farmacokinetiek in zowel in vivo en in vitro settings en onderzoekers die ervaring hebben met het bestuderen van metabole complicaties in vivo, waaronder leveraandoening en nierfalen. Afgelopen jaren is gewerkt aan het opzetten van een ex vivo darmmodel waarbij oa gebruik werd gemaakt van rest materiaal van varkens. De kennis hiervan wordt ook toegepast bij de praktische problemen die we tegenkomen bij de andere organen. Door deze kennis van meerdere onderzoeksgroepen binnen het instituut te combineren kunnen we optimaal gebruik maken van de aanwezig expertise binnen de onderzoeksgroepen. Ook zijn er veel (inter)nationale samenwerkingen waarbinnen de proefopzet en resultaten zullen worden getoetst.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Wetenschappelijk:

Doordat het aantal patiënten met metabole complicaties blijft stijgen ontstaat er een steeds grotere behoefte aan nieuwe medicatie voor deze patiënten. In deze patiënten zijn oa de lever, nier en darm aangedaan. Om gericht geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen is het belangrijk om te begrijpen hoe stoffen door deze organen worden behandeld om zo een uitspraak te kunnen doen over mogelijke dosering, bijwerkingen en interacties met andere stoffen of geneesmiddelen. Door middel van deze studies hopen we beter inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen die een rol spelen bij farmacokinetiek van stoffen in de verschillende organen.

Maatschappelijk belang:

Begrip van de kinetiek en interactie van stoffen in een (dys)functionerend orgaan kan in klinische setting gebruikt worden om dosering aan te passen voor specifieke omstandigheden in de patiënt (met verstoorde nier/lever/darm functie). Daarnaast kunnen bijwerkingen door drug-drug interactie voorkomen worden. Het goed kunnen voorspellen van de effecten van nieuwe therapeutica kan bijdragen aan het reduceren van klinische trials en de kans op falen in zo'n trial verlagen, wat een kostenverlagend effect heeft. Uiteindelijk kunnen beter voorspelbare modellen ook bijdragen aan het verkorten van de tijd die nu nodig is om nieuwe therapeutica op de markt te brengen. Dit kan leiden tot goedkopere medicatie voor de patiënt. Dit heeft socio-economische impact op samenleving en maatschappij. Ex vivo experimenten met restmateriaal of slachthuis materiaal kan leiden tot vermindering van het aantal dierproeven. Betere voorspelbare modellen kunnen bijdragen aan verfijning van dierproeven.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

De onderzoeksstrategie voor de darm ziet er als volgt uit:

Voor darm:

- 1). Verder bouwen aan bestaande methodologische kennis mbv ex vivo experimenten om zo meer kennis te genereren of (dys)functie van de verschillende compartimenten van de darm in dierlijk weefsel
- 2). Validatie van deze kennis door het bestuderen van farmacokinetiek van een bekende stof in verschillende compartimenten van de darm.
- 3). Deze kennis en resultaten toetsen aan humane literatuur
- 4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier.
- 5). Verder opzetten toegang tot humaan weefsel
- 6). Opgebouwde methodologische en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal

Voor de nier en lever weten we uit de literatuur dat het mogelijk is om de organen voor een bepaalde periode (ongeveer 6 uur) ex vivo in leven te kunnen houden. Dit moeten we eerst zelf ook praktisch kunnen uitvoeren. We maken hierbij veel gebruik van de bestaande kennis uit het transplantatie veld, we zijn op bezoek geweest bij een groep in Leicester waar ook ex vivo lever en nier experimenten worden gedaan, maar moeten dit nog wel zelf verder opzetten. Hiervoor zijn pilot experimenten nodig.

Experimenten en validatie experimenten die met de lever en de nier uitgevoerd moeten worden:

Opzetten technisch protocol, waarbij levensduur en functie de belangrijkste uitleesparameters zullen zijn. Voor functie is bij de lever is oa galproductie, bloedgaspH, glucose en lactaat een standaard uitlezing (in transplantatie setting). Voor de nier is dit oa klaring (inuline, PAH, creatinine), natrium en kalium excretie en eventueel glucose.

Als we dit praktisch in de vingers hebben dan moet er gekeken worden hoe de ex-vivo organen omgaan (o.a. omzetten en excretie) met bepaalde stoffen/medicijnen waarvan bekend is hoe deze in de mens worden verwerkt in vivo (validatie-experimenten). Dit zal vergeleken worden met de literatuur en humane data.

We verwachten hierbij dat de varkens organen hierin weinig verschillen met de mens en dat de resultaten overeen zullen komen met de gegevens bekend uit literatuur. Als we dit hebben kunnen bevestigen dan zullen ook

experimentele studies uitgevoerd worden waarbij medicijnen zullen worden getest die zich nog in de ontwikkelingsfase bevinden, dit zal in samenwerking met o.a. farmaceutische industrie worden gedaan. Ook hierbij zal de nadruk altijd zal liggen op het verbeteren van gezondheid van de mens.

De keuze om gebruik te maken van slachthuismateriaal of ex-vivo (vers) materiaal zal samenhangen met de kennis over de stof en het type orgaan. Voor lever en nier zal voor het technische opzetten zeker gekozen worden voor restmateriaal van andere proef of slachthuis, voor experimentele vragen zal dit per te testen stof of vraagstelling bekeken moeten worden.

Deze stappen zijn ook hieronder nogmaals stapsgewijs beschreven:

- 1). opzetten mogelijkheid om ex vivo nier en lever functie en farmacokinetiek te kunnen bestuderen in dierlijk weefsel. Hierbij zal gekeken worden naar functionele parameters, als die vergelijkbaar zijn met gegevens bekend uit de transplantatie wereld kunnen we ook farmacokinetische studies uitvoeren in een werkend orgaan.
- 2). Uitvoeren van validatie studies in dierlijk weefsel waarin klaring van een bekende stof wordt getest ex vivo.
- 3). Validatie experimenten vergelijken met bekende literatuur en humane data
- 4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier.
- 5). Opgebouwde methodologie en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal.

Het uiteindelijke doel is om met humaan weefsel de experimenten te doen. Hiervoor hebben we contact met lokale en academische ziekenhuizen, organisaties gespecialiseerd in transplantatie en is er een initiatief van TNO om een landelijke humane weefsels supply chain voor wetenschappelijk onderzoek in Nederland op te zetten.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Alle studies zullen plaatsvinden in organen van grote proefdieren (varkens). Afhankelijk van de vraag zal gekozen worden voor een klein of groot varken. Indien mogelijk zal gebruik worden gemaakt van slachthuismateriaal. Er wordt gekozen voor varkens omdat het maag-darm kanaal, de nier en de lever grote overeenkomsten vertonen met de mens. Voor lever en nier wordt gebruik gemaakt van apparatuur die ontwikkeld is voor de humane toepassing. Ook hiervoor is het gebruik van varkens materiaal het meest geschikt daar de anatomie grotendeels overeenkomt.

Darm: ex vivo permeabiliteits/ PK studies zullen uitgevoerd worden voor verschillende wetenschappelijke doeleinden waaronder het bestuderen van het effect van allergenen op de darmpermeabiliteit en de samenstelling en functie van de mucosa.

Lever en nier:

Opzetten van ex vivo perfusie experimenten. Indien mogelijk zullen we voor de pilot experimenten gebruik maken van organen afkomstig van dieren die voor een andere proef/andere doeleinden gedood zijn. Als methode gevalideerd is zullen studies worden opgezet om PK en drug-drug interacties van therapeutica te bestuderen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Voor de darm worden regelmatig experimenten uitgevoerd om de kinetiek van stoffen (nieuwe geneesmiddelen) in de darm te bestuderen. Om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van de effecten van een stof kunnen we nu ook data afkomstig van verschillende organen met elkaar koppelen.

Voor nier en lever zijn er een aantal methodologische doelen die eerst behaald moeten worden. Hierbij zijn een aantal milestones en GO/NoGo momenten gedefinieerd.

Milestone 1: Lever en/of nier functioneel te houden (minimaal 4 uur) in ex vivo perfusie set up. Functie wordt bepaald door op uiterlijke kenmerken te focussen zoals kleur, urine/gal productie, maar ook op meetbare uitlezingen zoals lactaat en PH voor de lever en GFR voor de nier.

G/NG: tijdsduur moet uitwijzen of de organen lang genoeg stabiel blijven om een betrouwbaar experiment te doen

Milestone 2: Bepalen van betrouwbare functionele en/of voorspellende read outs. We willen hier bovengenoemde markers valideren en waar mogelijk uitbreiden of verfijnen.

G/NG: bekende functie markers voor lever (bijv lactaat/AST/ALT) en voor de nier (creatinine, inuline) moeten te detecteren zijn en moeten geen grote spreiding laten zien.

Milestone 3: kinetiek van referentie compound bestuderen in ex vivo setup en vergelijken met bekende in vivo data

G/NG: als waarden niet overeenkomen moet nagedacht worden of model geschikt is.

Indien bovenstaande milestones behaald zijn is het model geschikt gebleken voor het type studies dat we in de toekomst willen gaan uitvoeren en kunnen andere vragen zoals beschreven in 3.2 onderzocht worden.

Uiteindelijk is het doel om alle opgedane kennis vanuit het varken te gebruiken bij experimenten op humane organen.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	