



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie 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.	50100				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.1</td><td>Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.1	Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm
Volgnummer	Type dierproef					
3.4.4.1	Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Uit varkens worden darmen, lever en nier geïsoleerd om ex vivo studies te kunnen uitvoeren. Organen zullen worden aangesloten op een orgaanperfusiesysteem en/of geïmplementeerd in ex vivo model en functie en kinetiek van stoffen zullen bestudeerd worden. Op die manier kan met 1 dier verschillende condities getest worden.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Onder terminale anesthesie zullen organen worden geïsoleerd, gecanuleerd en overgebracht naar orgaan perfusiesystemen. Hierna zal het dier worden getermineerd of ter beschikking worden gesteld voor andere onderzoeksdoeleinden.

Indien nodig dan zullen de dieren voorafgaand aan de isolatie, terwijl ze al onder anesthesie zijn, gehepariniseerd worden. Dit om stolling van bloed in de organen te voorkomen, dit kan de metingen verstoren.

Onder farmacokinetiek valt ook het bestuderen van drug-drug interacties. Hiervoor kan het nodig zijn dat er voorafgaand aan het experiment in vivo al een bepaalde plasma spiegel of concentratie van de te bestuderen stof aanwezig moet zijn om de interactie van een andere stof hierop ex vivo te kunnen bestuderen. Hiervoor kan het nodig zijn om de dieren voorafgaand aan terminatie of onder terminale anesthesie een oplaad dosis krijgen of vooraf worden behandeld met de stof. Manier van toediening zal afhankelijk zijn van de te testen stof, bij voorkeur zal oraal worden toegediend (bijvoorbeeld via het voer of

met capsule), first pass effect is immers via de lever en hiervoor is dat de meest logische route. Indien nodig zal er bloedafname, speeksel, faeces en/of urine verzameling plaats vinden.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Aantal dieren per studie en per groep is afhankelijk van de vraagstelling, diersoort, en belangrijkste uitleesparameters.

Omdat we voor ex vivo perfusie van lever en nier nog geen pilotdata beschikbaar hebben kan op dit moment nog geen onderbouwde poweranalyse gedaan worden. We willen eerst een pilot experiment uitvoeren waarin de eerder genoemde technologische vragen beantwoord zullen worden. Op basis van de gegevens die we zullen verkrijgen uit de eerste experimenten zal een inschatting gemaakt worden van de variatie en op basis daarvan de benodigde aantallen per studie bepaald.

Voor het geplande pilot experiment kunnen we wel gebruikmaken van de gedefinieerde functionele uitlees parameters. Voor de nier gaan we de functie uitlezen dmv glomerulaire filtratie snelheid (GFR). Deze wordt berekend uit de inuline klaring, wat tot nu toe wordt gezien als de gouden standaard meting voor nierfunctie. Omdat het uiteindelijk doel is PK studies uit te voeren in zieke organen willen we gezonde vs zieke nieren vergelijken. We gaan ziekte in de nier induceren door deze ex vivo te behandelen met een toxine of ischemie/reperfusie induceren. Voor zieke nieren gaan we uit van een GFR die 50% lager ligt dan de normale functie. Voor deze pilot houden we rekening met een standaard deviatie van 30%.

Met een alpha van 0.05 en een power van 0.8 komen we dan op een sample size van 6 dieren per groep (6 zieke en 6 gezonde nieren) om voor het pilot experiment om GFR verschillen te kunnen detecteren.

Omdat we lever en nier uit 1 dier halen is voor de lever geen aparte berekening gemaakt. Uit dit pilot experiment verkrijgen we informatie over de correlatie tussen de orgaan functie en de farmacokinetiek in dit orgaan. Dit stelt ons in staat om binnen 1 dier de klaringseffecten te koppelen aan functionele parameters, waardoor we voor vervolggexperimenten naar verwachting kunnen volstaan met 6 dieren per vraagstelling. Deze bevindingen zullen worden vergeleken met de humane data waardoor we ook een inschatting kunnen maken over de translationaliteit en de robuustheid van het model. De methode zal robuust genoeg moeten zijn om gezond en gradaties van ziekte te kunnen onderscheiden.

Daarnaast is het uiteindelijke doel om dit toe te passen in mens waarbij we ook variatie verwachten.

Daarom zullen we altijd orgaan functie koppelen aan kinetiek. De data die nu in het varken wordt gegenereerd zal gebruikt worden om het humane materiaal zo efficiënt mogelijk te kunnen gebruiken en uiteindelijk zal ook de overstap worden gemaakt naar humaan materiaal.

Naar verwachting zijn 15 tot 20 experimenten met 6 varkens nodig voordat de volledige overstap naar humaan materiaal gemaakt kan worden. Uiteraard zal, indien we in de loop van het project voldoende kennis hebben opgedaan om de overstap naar humaan materiaal eerder te maken, de overstap eerder worden gemaakt.

Omdat de experimenten arbeids intensief zijn kunnen er maar max 2 dieren per maand worden ingezet (dus max 24 per jaar)=120 per 5 jaar.

Darmstudies zijn in het verleden al vaker uitgevoerd. Voor darm studies verwachten we 60 varkens nodig te hebben in een periode van 5 jaar (Omdat we met de huidige opzet 96 condities in 1 varken kunnen testen, waaronder regionale absorptie van stoffen, verschillende doseringen/formuleringen, is er veel vraag naar deze experimenten. We verwachten 1 varken per maand in te zetten voor deze doeleinden). We zullen altijd de nier/lever en darm experiment combineren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort en herkomst

Er zal voor deze studie gebruik gemaakt worden van volwassen SPF varkens. Afhankelijk van de vraag zal gekozen worden voor varkens < 15 kg (minipigs), varkens van 15-60 kg of varkens > 60 kg. We hebben geen voorkeur voor bepaald geslacht en zullen gebruik maken van het dier dat op dat moment beschikbaar is.

Geschatte aantallen

Voor darm studies verwachten we 60 varkens nodig te hebben in een periode van 5 jaar (Omdat we met de huidige opzet 96 condities in 1 varken kunnen testen, waaronder regionale absorptie van stoffen, verschillende doseringen/formuleringen, is er veel vraag naar deze experimenten. We verwachten 1 varken per maand in te zetten voor deze doeleinden). Voor de lever en nier PK studie verwachten we max 120 dieren nodig te hebben. We streven er naar om darm en lever en nier studies zoveel mogelijk te combineren en zouden dan max 120 dieren nodig hebben in 5 jaar.

Onderbouwing diersoort

Wat betreft het translationele aspect en de vervolgstappen richting de mens verwachten we dat het gebruik van varkens materiaal een goede uitgangsbasis vormt voor het opzetten van de techniek, de grootte van de organen is vergelijkbaar, maar ook dat varkensmateriaal geschikt is om een voorspelling te kunnen doen voor de mens. Het maagdarm kanaal van het varken lijkt sterk op de van de mens en veel processen zijn vergelijkbaar, waardoor voor een groot aantal medicijnen de farmacokinetiek vergelijkbaar zal zijn met de mens. Er zijn echter uitzonderingen, zoals bijvoorbeeld beschreven door Dalgaard in 2015 (Comparison of minipig, dog, monkey and human drug metabolism and disposition, J. Pharmacol. Toxicol Methods, 2015), en hiermee zal dan ook rekening mee gehouden worden.

Herkomst: Alleen indien geen geschikt rest materiaal van een andere proef of slachthuismateriaal beschikbaar is, zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. De aangekochte varkens zijn afkomstig van een gecertificeerd SPF fokbedrijf.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Gebruik maken van puur in vitro systemen is voor complexe organen nog niet mogelijk. Ook is er weinig humaan materiaal beschikbaar om ex vivo metingen op te doen. We willen uiteindelijk gebruik maken van humaan weefsel maar gebruiken als tussenstap het varken om de methode op te zetten en te valideren.

We dragen bij aan het verminderen en verfijnen van dierproeven doordat er in 1 varken meerdere condities worden bestudeerd, darm/lever en nier functie. Ook zullen we na isolatie van de organen de dieren en/of organen ter beschikking stellen voor overig kortdurend wetenschappelijk onderzoek dat onder terminale anesthesie plaats kan vinden.

Ten eerste wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van materiaal afkomstig uit andere experimenten of van slachthuismateriaal. Dit zal van toepassing zijn voor pilot experimenten en voor de validatie studies. Voor

overige experimenten kan nu nog niet voorzien worden of dit mogelijk is. We streven ernaar om alleen ex vivo materiaal te gebruiken als duidelijk is dat de onderzoeksvraag op vers weefsel moet worden getest en dat slachthuismateriaal geen optie is. Aan het gebruik van materiaal afkomstig uit een andere proef of dieren die voor onderwijsdoeleinden zijn gebruikt zitten wel beperkingen. Dieren kunnen een ziekte historie hebben die niet samen gaat met onze vraagstelling. Dit kan tot gevolg hebben dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag geen gebruik gemaakt kan worden van dieren afkomstig uit andere proeven. Voor elke onderzoeksvraag zullen we in kaart brengen in welke tijdsperiode een dier nodig is voor de studie. Dit hangt o.a. af van de onderzoeksvragen die ons door onze klanten (universiteiten, overheid en business partners) worden voorgelegd). Wij inventariseren dan in eerste instantie of binnen het tijdbestek waarin de studie kan worden uitgevoerd, een dier beschikbaar komt uit onderwijs of ander onderzoek. Hiervoor hebben wij een netwerk opgezet van onderzoekers in Nederland die met varkens werken. We maken nu al gebruik van een bestaande samenwerking met 1 instellingsvergunninghouder waarbij organen gedeeld worden en daarnaast zullen we, daar waar mogelijk, samenwerkingen opzetten met andere instellingsvergunninghouders om zoveel mogelijk toegang te krijgen tot restmateriaal. We zullen actief meewerken aan een landelijk initiatief vanuit het platform IvDs om proefdiermateriaal te delen. Alleen indien geen restmateriaal beschikbaar is zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. Tevens zullen we vraagstellingen voor de verschillende organen combineren; we zullen dus nooit een dier opofferen en dan maar gebruik maken van 1 orgaan, maar altijd het beschikbare materiaal optimaal benutten. Factoren die hierbij een rol spelen zijn oa de werkzaamheid van de te testen stof en de hieraan gekoppelde uitleesparameters.

Tot slot werken we ook toe naar het opzetten van een vitale humane tissue supply chain, waarbij het de bedoeling is dat dit zelfde type onderzoek gedaan kan worden met humane weefsels (afval materiaal uit OKs en/of afgekeurde donororganen). Dit is nu nog niet gerealiseerd en daarom is de huidige aanvraag van belang om de ex vivo modellen op te zetten en te valideren.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Dieren worden voorafgaand aan de proef 14 dagen geacclimatiseerd. Indien een test stof toegediend zal moeten worden zal dit in overleg met de betrokken IVD en dierenarts plaatsvinden om het ongerief tot het minimum te beperken. Overige handelingen zullen plaatsvinden onder terminale anesthesie.

We verwachten dat de te testen stoffen, die waarschijnlijk mede worden aangeleverd door de voedingsindustrie of de farmaceutische industrie, al zover ontwikkeld en onderzocht zijn dat deze geen nadelige effecten zullen hebben op het dier. Deze medicijnen of voedingsmiddelen/supplementen zullen al zover doorontwikkeld zijn dat ons model de stap is voordat de stoffen daadwerkelijk in klinische trials zullen worden getest, er zullen dus al veel eigenschappen van deze stof bekend zijn. Hoewel dit niet wordt verwacht, zal bij optreden van onbekende bijwerkingen die een negatieve invloed hebben op het welzijn van het dier de toediening direct worden gestopt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

nvt

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Bij proeven waarbij alle handelingen plaatsvinden onder terminale anesthesie is de ongerief terminaal. Naar schatting is dit het grootste gedeelte van de experimenten (95%).

Bij proeven waarbij dieren vooraf behandeld worden met therapeutica of een microdosering van een tracer kan het ongerief licht zijn. We verwachten dat in maximaal 5% van de proeven een toediening voor nodig is. Bij orale toediening via het voer is geen ongerief te verwachten (1%). Bij het toediening van een oplaaddosis onder terminale anesthesie is ook geen extra ongerief te verwachten (2-3%). Als voor de oplaaddosis of microdosering een injectie of infusie nodig is die niet onder anesthesie kan plaatsvinden is het ongerief licht (1-2%).

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

x Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Organen worden geïsoleerd uit het dier

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja