



Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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 2.1 aangekruiste categorieën.

Darm, lever en nier zijn organen die een heel belangrijke rol spelen in het bepalen van de zowel de kinetiek als het effect van geneesmiddelen en voedingsmiddelen. Belangrijke processen hierbij zijn 1) absorptie van stoffen (met name het maag-darm kanaal), 2) distributie van stoffen in het lichaam 3)

metabolisme van stoffen (lever en darm) en 4) excretie van stoffen (nier, lever). Naast geneesmiddelen en voedingsmiddelen worden we oraal (darm) ook blootgesteld aan verschillende type verontreinigingen, zoals microplastics en fijnstof, die mogelijk een schadelijke uitwerking kunnen hebben. Begrip van en onderzoek naar deze processen in gezonde en disfunctionerende organen is daarom van groot belang. Het kan bijvoorbeeld 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 of drug-food interactie voorkomen worden.

Om deze processen te bestuderen zijn klinische studies met mensen niet of nauwelijks mogelijk en is het noodzakelijk om gebruik te maken van goede voorspellende en translationele (i.e. mogelijk om resultaten te vertalen naar klinische setting) in vitro/ex vivo modellen. In dit onderzoek ontwikkelen en implementeren we deze innovatieve ex vivo orgaan modellen waarmee we de effecten en kinetiek van stoffen (o.a. geneesmiddelen, voedingsmiddelen en milieuverontreinigingen) kunnen bestuderen in darm, lever en nier. De dierproef die hiervoor nodig is omvat het opofferen van een dier en het isoleren van organen/weefsels die vervolgens kunnen worden toegepast in laboratoriummodellen waarin veel verschillende condities kunnen worden bestudeerd.

Belangrijke kracht is de combinatie met zogenaamde in silico modellen, waarmee we resultaten kunnen vertalen naar klinische setting. Hiervoor zullen data ook vergeleken worden met resultaten verkregen met humaan materiaal (zoals afgekeurde donor organen, uitgenomen zieke organen of materiaal dat beschikbaar komt na operatie). Dit humane materiaal is echter schaars beschikbaar, daarom is het noodzakelijk om gebruik te maken van weefsel van proefdieren in translationale modellen om de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en voedingsmiddelen sneller te laten plaatsvinden en beschikbaarheid op de markt te versnellen.

In deze studie maken we gebruik van weefsel van varkens. Varkensweefsel komt wat betreft fysiologie, functionaliteit en omvang van de organen heel goed overeen met menselijk weefsel. Hierdoor is de vertaalslag naar de mens gemakkelijk te maken, en is de acceptatie van toepassing van varkensweefsel als alternatief voor humaan weefsel erg groot in de medische wereld. Hieronder geven we een aantal voorbeelden van waar verschillende typen weefsel van varkens voor gebruikt kan worden. Naast varkens die specifiek worden opgeofferd voor de studie, wordt er zo veel mogelijk gebruik gemaakt van slachtafval of proefdieren die voor een ander doeleinde worden gedood.

Darm: Voor de darm studies willen we gebruik maken van al bestaande systemen namelijk het InTESTine™ platform en het Intestinal Explaint Barrier Chip (IEBC) platform. Het InTESTine™ is een medium throughput platform, wat betekent dat we met 1 stuk darmweefsel meer dan 96 condities kunnen testen. Het IEBC is een low/medium throughput platform, wat betekent dat er met 1 stuk darmweefsel maximaal 32 condities getest kunnen worden. Met deze modellen kunnen we verschillende vraagstellingen beantwoorden die gericht zijn op o.a. 1) voorspellen van orale absorptie van geneesmiddelen en voedingsmiddelen, 2) (nadelige) effecten van geneesmiddelen, voedingsmiddelen of milieuverontreinigende stoffen in gezonde en zieke situatie, 3) host-microbe interacties (e.g. interactie met pathogenen en/of probiotica).

Lever en nier: Hiervoor maken we gebruik van bestaande orgaanperfusie machines om lever en nier ex vivo te bestuderen om meer informatie te krijgen over hoe deze organen met geneesmiddelen en voedingsmiddelen omgaan en op welke manier ze een rol spelen in de kinetiek van deze stoffen in ziekte en gezondheid. Gecombineerde orgaanperfusie buiten het lichaam (lever+nier) levert belangrijke inzichten op in orgaan crosstalk in deze processen (bijvoorbeeld afbraak van geneesmiddelen in lever ne klaring in de urine). In de toekomst willen we ook werken aan gecombineerde orgaanperfusie van meerdere organen, inclusief darm, lever nier en pancreas. Resultaten tot nu toe laten zien dat deze orgaan perfusie modellen goed voorspellend zijn voor de in vivo situatie. Orgaan perfusie modellen kunnen worden ingezet voor 1) het voorspellen van het gedrag en effect van medicijnen en voedingsmiddelen in ontwikkeling 2) testen van (nadelige) effecten van stoffen in gezonde en zieke situatie, 3) optimaliseren van protocollen voor

orgaanperfusie in de kliniek (orgaan perfusie wordt steeds meer ingezet in klinische setting voor orgaan transplantatie) en 4) ontwikkelen van nieuwe biomarkers die iets zeggen over het functioneren van organen (vooral voor de nier is er een gebrek aan goede functionele en voorspellende markers, met name vanwege de complexiteit van dit orgaan).

Dit onderzoek zal bijdragen aan meer inzichten in de rol van darm, lever en nier in de klaring en effect van geneesmiddelen en voedingsmiddelen in gezonde en zieke situatie. Hiermee draagt het bij aan het verbeteren en versnellen van ontwikkeling van therapieën voor de patiënt, en minder proefdiergebruik.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Het doel van het onderzoek is het bestuderen van functie, kinetiek, metabolisme en/of effecten van geneesmiddelen, voedingsmiddelen en milieuverontreinigende stoffen in ex vivo organen en/of orgaanweefsel. Het gaat hierbij specifiek om first-pass organen zoals darm, lever en nier. Dit zal in preklinische setting plaatsvinden, waarbij de ex vivo methodes worden opgezet, verfijnd en gevalideerd voor verschillende toepassingen. Het uiteindelijke doel is om de verworven kennis toe te passen op en vergelijken met humaan materiaal (dat slechts minimaal beschikbaar is) en om verworven kennis toepasbaar te maken voor de mens en kliniek.

Voorbeelden van onderzoeksvragen die met dit onderzoek kunnen beantwoorden:

- Wat zijn de verschillen in regionale absorptie in de darm (duodenum, jejunum, ileum, colon) van stoffen en hoe vertaalt zich dit in de voorspelling van systemische blootstelling?
- Welke invloed hebben externe factoren (omgeving, stress, behandeling, ziekte, ontsteking) op de darmdoorlaatbaarheid van stoffen en hoe kunnen we die moduleren?
- Welke invloed hebben externe factoren (omgeving, stress, behandeling, ziekte, ontsteking) op de lever klaring en renale klaring van stoffen en hoe kunnen we die moduleren?
- Wat zijn de speciesverschillen in absorptie, distributie, metabolisme en excretie van stoffen (muis, rat, hond, varken, mens)?
- Hoe kunnen we weefsel langdurig ex vivo in leven houden zodat verschillende orgaan functionaliteiten onderzocht kunnen worden, inclusief immunologische reacties en langdurige blootstelling aan stoffen (opties: microfluidics, orgaan perfusie, zuurstof voorziening)
- Wat is het effect van acute stress in het orgaan op het functioneren en kinetiek van geneesmiddelen en voedingsmiddelen. Hoe vertaalt zich dit naar chronische schade?
- Kunnen we functionele en voorspellende (bio)markers identificeren in ex vivo modellen die orgaanfunctie en/of -falen weerspiegelen? Hoe vertalen deze naar de klinische setting, o.a. transplantatiegeneeskunde, darm, lever en nier ziektes.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Dit project heeft een hoge haalbaarheid doordat de betrokken onderzoeksgroepen veel expertise hebben op het gebied van toepassen van ex vivo weefsel (zie referenties). De betrokken onderzoekers hebben een brede expertise op het gebied van voorspellen en modelleren van kinetiek van oa voedingsstoffen en medicijnen in gezondheid en ziekte. Afgelopen jaren is gewerkt aan het opzetten van ex vivo darm-, lever- en niermodellen 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 en vergeleken met klinische en/of in vivo (mens/dier) data.

Referenties:

1. Intestinal explant barrier chip: long-term intestinal absorption screening in a novel microphysiological system using tissue explants. Eslami Amirabadi H, Donkers JM, Wierenga E, Ingenhous B, Pieters L, Stevens L, Donkers T, Westerhout J, Masereeuw R, Bobeldijk-Pastorova I, Nooijen I, van de Steeg E. *Lab Chip*. 2022 Jan 18;22(2):326-342. doi: 10.1039/d1lc00669j.
2. Evaluation of Normothermic Machine Perfusion of Porcine Livers as a Novel Preclinical Model to Predict Biliary Clearance and Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions Using Statins. Stevens LJ, Zhu AZX, Chothe PP, Chowdhury SK, Donkers JM, Vaes WHJ, Knibbe CAJ, Alwayn IPJ, van de Steeg E. *Drug Metab Dispos*. 2021 Sep;49(9):780-789. doi: 10.1124/dmd.121.000521. Epub 2021 Jul 30.
3. Towards human ex vivo organ perfusion models to elucidate drug pharmacokinetics in health and disease. Stevens LJ, Donkers JM, Dubbeld J, Vaes WHJ, Knibbe CAJ, Alwayn IPJ, van de Steeg E. *Drug Metab Rev*. 2020 Aug;52(3):438-454. doi: 10.1080/03602532.2020.1772280. Epub 2020 Jun 18.
4. An Ex Vivo Fermentation Screening Platform to Study Drug Metabolism by Human Gut Microbiota. van de Steeg E, Schuren FHJ, Obach RS, van Woudenberg C, Walker GS, Heerikhuisen M, Nooijen IHG, Vaes WHJ. *Drug Metab Dispos*. 2018 Nov;46(11):1596-1607. doi: 10.1124/dmd.118.081026. Epub 2018 Aug 29.
5. Regional Expression Levels of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes along the Pig and Human Intestinal Tract and Comparison with Caco-2 Cells. Vaessen SF, van Lipzig MM, Pieters RH, Krul CA, Wortelboer HM, van de Steeg E. *Drug Metab Dispos*. 2017 Apr;45(4):353-360. doi: 10.1124/dmd.116.072231. Epub 2017 Feb 2.
6. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. Westerhout J, van de Steeg E, Grossouw D, Zeijdner EE, Krul CA, Verwei M, Wortelboer HM. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Oct 15;63:167-77. doi: 10.1016/j.ejps.2014.07.003. Epub 2014 Jul 18.
7. A higher throughput and physiologically relevant two-compartmental human ex vivo intestinal tissue system for studying gastrointestinal processes. Stevens LJ, van Lipzig MMH, Erpelinck SLA, Pronk A, van Gorp J, Wortelboer HM, van de Steeg E. *Eur J Pharm Sci*. 2019 Sep 1;137:104989.
8. Prediction of Oral Absorption of Nanoparticles from Biorelevant Matrices Using a Combination of Physiologically Relevant In Vitro and Ex Vivo Models. Westerhout J, Bellmann S, van Ee R, Havenaar R, Leeman W, et al. *J Food Chem Nanotechnol* 2017 3(4): 111-119.
9. Advanced epithelial lung and gut barrier models demonstrate passage of microplastic particles. Donkers, J.M., Höppener, E.M., Grigoriev, I. et al. *Micropl.&Nanopl.* 2, 6 (2022)

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Wetenschappelijk belang:

Om gericht geneesmiddelen en voedingsmiddelen te kunnen ontwikkelen is het belangrijk om te begrijpen hoe stoffen door organen zoals darm, lever en nier 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 de kinetiek van deze stoffen in de verschillende organen.

Daarnaast kunnen dezelfde ontwikkelde modellen toegepast worden voor onderzoek naar potentieel schadelijke effecten van milieuverontreinigende stoffen, o.a. microplastics.

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 bijwerken 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. Beter voorspellende modellen kunnen bijdragen aan verfijning van dierproeven.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Belanghebbenden in dit project zijn onder andere: burgers, patiënten, wetenschappers, farmaceutische bedrijven

- Patiënten en burgers zullen gebaat zijn bij dit onderzoek omdat het bijdraagt aan kennis over functioneren van organen en het gedrag van geneesmiddelen en voedingsmiddelen in gezondheid en ziekte. Met die kennis kunnen sneller nieuwe therapieën ontwikkeld worden, en kunnen ongewenste bijwerkingen van medicijnen verminderd worden.
- De betrokken onderzoekers zullen kennis vergaren en publiceren.
- De farmaceutische- en voedingsindustrie die geïnteresseerd is in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en voedingsmiddelen (o.a. prebiotica, probiotica, infant formula) hebben belang bij de data van deze ex vivo modellen. Met de uitkomst van deze data zullen ze besluiten of ze wel of niet verder gaan met het testen van de stoffen in klinische studies.
- **TNO heeft zowel wetenschappelijk als commercieel belang bij dit onderzoek. TNO wil excellent onderzoek verrichten om nieuwe therapieën naar de markt te helpen. In sommige gevallen zijn hierbij dierproeven de meest adequate manier om deze vraagstelling te beantwoorden.**
- De dieren zelf zijn ook belanghebbend, hoewel ze geen inspraak hebben, leveren ze een onmisbare bijdrage aan de te bereiken doelen van dit project. De dieren zullen worden opgeofferd voor de doelen van dit project. Het ongerief zal hierbij tot een minimum beperkt blijven door de dieren te euthanaseren.

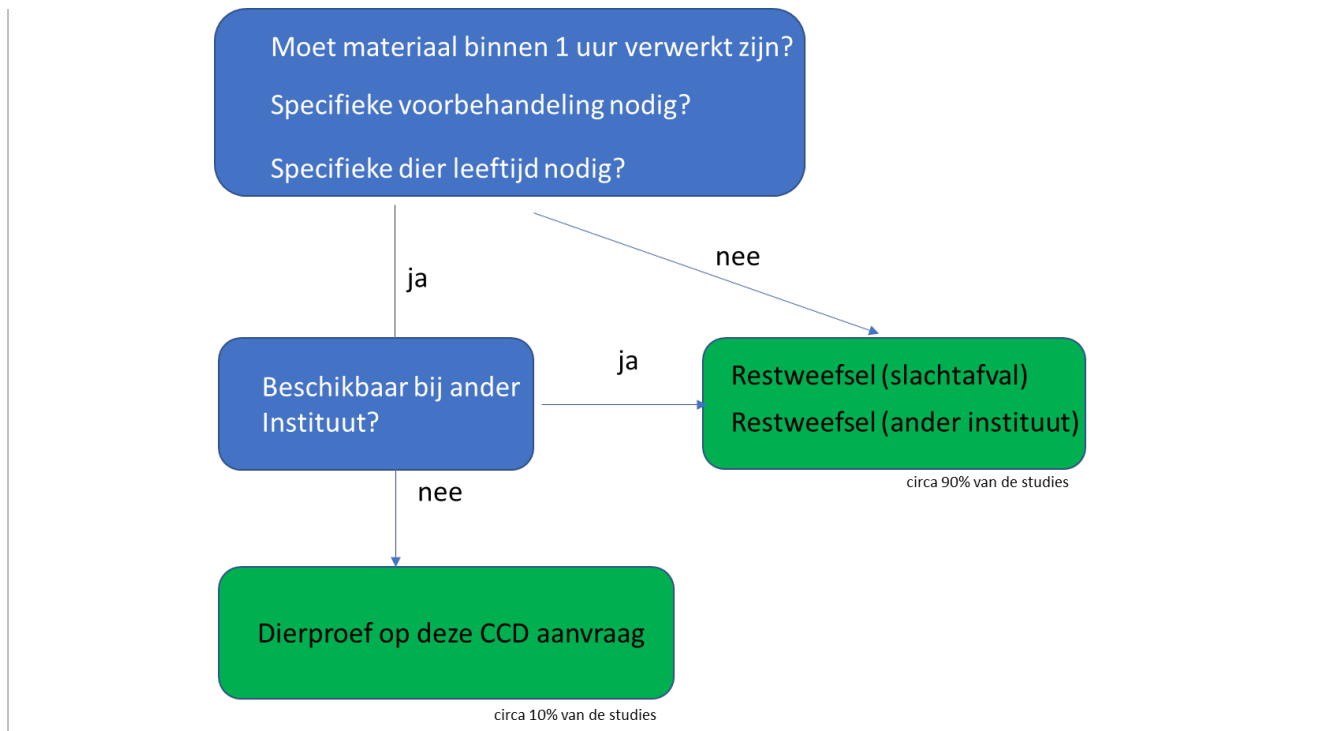
3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Algemene opzet van project: per wetenschappelijk of klant-vraag zal worden geïnventariseerd welke dierlijke materialen nodig zijn om die vraag te beantwoorden. Daarna zal worden gekeken of er gebruik gemaakt kan worden van rest materiaal of slachthuis materiaal of dat er een dier apart voor moet worden aangevraagd indien rest materiaal niet beschikbaar. Na euthanasie zullen de organen worden gebruikt in het experiment.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Daar waar mogelijk zal gebruik worden gemaakt van rest materiaal. **In het verleden is 90% van het benodigde weefsel verkregen via restmateriaal van het slachthuis of andere instituten.** Indien dit niet beschikbaar is of behandeling van het dier voorafgaand aan de proef noodzakelijk is zal gebruik gemaakt worden van een voor de proef aangevraagd dier.



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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Isoleren van organen voor het ex vivo bestuderen van orgaanfuncties en de kinetiek en effecten van stoffen in darm, lever en/of nier
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	