



BPRC

Proefdierkundig Jaarverslag

2016



Inhoud

Inleiding

Onderzoeksonderwerpen binnen het BPRC	4
Traject voorafgaand aan een dierproef	4
Dierexperimenten Commissie (DEC) en Instantie voor Dierenwelzijn (IvD)	5
Aantallen DEC en IvD aanvragen	8

Dierexperimenteel onderzoek

Huisvesting en verzorging	9
Diertraining en welzijn	10
Diergeneeskunde	10
Ethologie	10
Details dierexperimenteel onderzoek	11
Immunobiologie	13
Virologie	14
Parasitologie	17
Uitgelicht: PET/CT scan	22
Vergelijkende Genetica en Verfijning	25
Alternatieven	26

Openheid en communicatie	29
--------------------------------	----





Het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) is een wetenschappelijk instituut dat zowel verkennend als toegepast biomedisch onderzoek verricht in het belang van de volksgezondheid. Daarnaast levert het BPRC een actieve bijdrage aan de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven.

Het doel van het verkennend onderzoek is het verkrijgen van kennis over het ontstaan en het verloop van chronische- en infectieziektes. Het doel van het toegepast onderzoek is om een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen of behandelingen voor ernstige ziektes. Dit zijn langdurige processen die helaas -nog- niet mogelijk zijn zonder dierproeven. Zij gaan dan ook vergezeld van maatschappelijke zorg over het welzijn van de proefdieren. Naast onderzoek waarbij proefdieren ingezet worden, wordt er in het BPRC ook onderzoek gedaan om alternatieven voor het gebruik van proefdieren te ontwikkelen. Het BPRC heeft een actief en uitgebreid programma voor het ontwikkelen van alternatieven volgens de principes van de drie V's die staan voor **V**ervanging, **V**ermindering en **V**erfijning. Onderzoek naar het ontwikkelen van alternatieven is deels ondergebracht in een specifieke, zelfstandige onderzoeksgroep. Daarnaast wordt instituut breed in alle andere onderzoeksafdelingen het ontwikkelen en het gebruik van alternatieven actief ondersteund en gestimuleerd.



Het BPRC onderkent de verantwoordelijkheid die de inzet van dieren ten behoeve van de menselijke gezondheid met zich meebrengt. In het kader van maatschappelijk verantwoord ondernemen (MVO) streven wij ernaar om mede middels dit proefdierkundig jaarverslag het publiek te informeren en openheid te verschaffen over:

- de projecten waarvoor dieren worden ingezet (Code Openheid Dierproeven),
- de rol van de Dierexperimenten Commissie en de Instantie voor Dierenwelzijn,
- het aantal dieren dat is ingezet in 2016,
- de ontwikkelingen op het gebied van alternatieven voor dierproeven.

Onderzoeksonderwerpen binnen het BPRC

De gezondheid van mensen in grote delen van de wereld is de afgelopen 100 jaar aanzienlijk verbeterd. Deels is dit het gevolg van toegenomen hygiënische omstandigheden maar voor een groot deel ook van geneesmiddelen en vaccins die in deze periode, vaak mede dankzij proefdieronderzoek, zijn ontwikkeld. Om ziektes die nog niet voorkomen of genezen kunnen worden succesvol te bestrijden is uitbreiding van onze kennis noodzakelijk. Biomedisch onderzoek vormt de basis voor de ontwikkeling van nieuwe en veilige medicijnen en therapieën.

Het BPRC is het grootste niet-commerciële primatencentrum van Europa en speelt een centrale rol bij het biomedisch onderzoek naar ernstige menselijke ziektes. Het BPRC verricht geen onderzoek voor de ontwikkeling van cosmetica (bij wet verboden), recreatieve drugs of wapens. Bij het BPRC wordt wel onderzoek verricht met als doel om ziektes zoals AIDS, griep, West Nilevirus, Denguevirus, Zikavirus, malaria, tuberculose, multiple sclerose, reumatoïde artritis en de ziektes van Parkinson en Alzheimer te bestrijden. Tevens wordt er gewerkt aan medische vraagstukken zoals transplantaat afstoting. De Nederlandse wet bepaalt dat hiervoor alleen apen ingezet mogen worden als er geen geschikte alternatieven zijn. Naast de incorporatie van de drie V principes (vervanging, vermindering en verfijning) bij al het onderzoek waarbij proefdieren ingezet worden, wordt er in dit kenniscentrum in een aparte, zelfstandige unit onderzoek gedaan om alternatieven voor het gebruik van proefdieren te ontwikkelen.

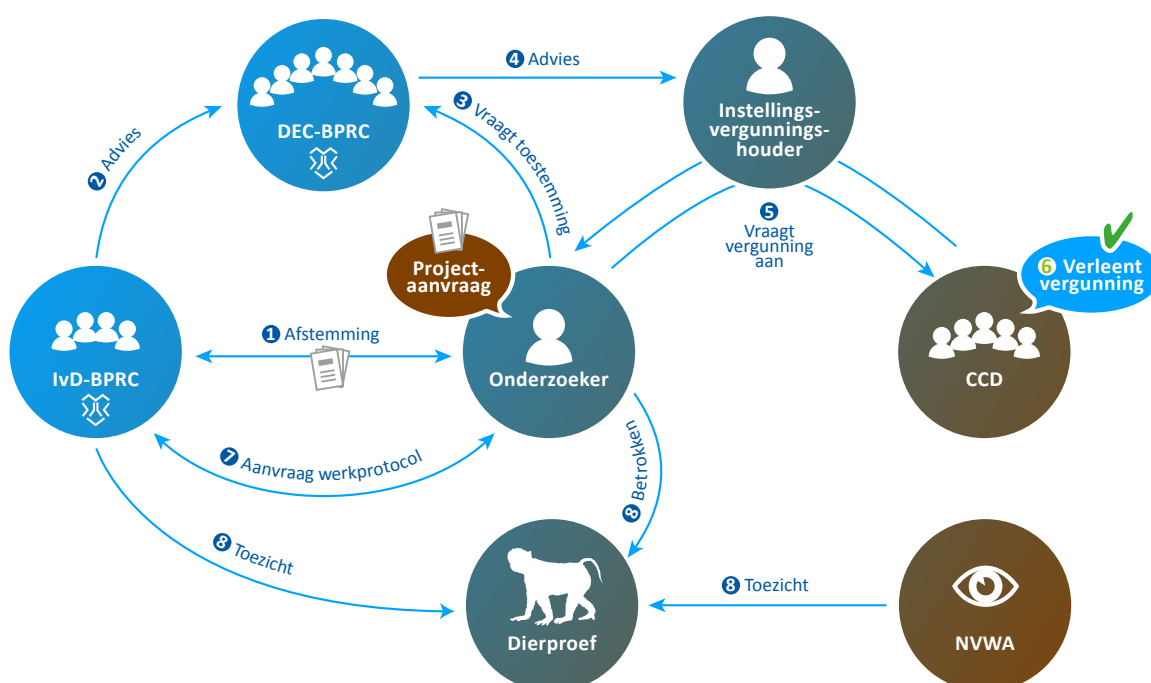
Traject voorafgaand aan een dierproef

Voordat een dierproef uitgevoerd kan worden, is er al een lange weg afgelegd. De eerste selectie van kandidaat geneesmiddelen of vaccins vindt altijd plaats in het laboratorium door middel van *in vitro* technologie. Hierbij worden proeven in het lab gedaan (bijvoorbeeld weefselkweektechnieken) en worden geen proefdieren gebruikt. Hoe beter deze technologie de situatie in levende mensen of dieren (*in vivo*) benadert, des te beter de voorspellende waarde voor de eventuele werking in de mens. Na een *in vitro* testfase kunnen mogelijk interessante kandidaat geneesmiddelen of therapeutische benaderingen in aanmerking komen voor *in vivo* testen. Deze kunnen binnen het BPRC, maar ook binnen andere onderzoekscentra, universiteiten of kenniscentra ontwikkeld zijn. Belangrijk is dat, ondanks al het verrichte voorwerk, er in geen geval een dierproef gestart kan worden zonder dat daarvoor een positief advies van de centrale commissie dierproeven is afgegeven.

Dierexperimenten Commissie (DEC) en Instantie voor Dierenwelzijn (IvD)

De Dierexperimenten Commissie (DEC) heeft de taak om een ethische afweging te maken tussen de gevolgen voor de gezondheid en het welzijn van het proefdier enerzijds en het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproef anderzijds. Een belangrijk onderdeel van die ethische afweging is de taak om het voorstel om proefdieren in te zetten nauwgezet te toetsen op de mogelijkheid van het gebruik van alternatieve methoden. Als de beoogde antwoorden ook zonder inzet van proefdieren (vervanging), of met de inzet van minder proefdieren (vermindering), of met een andere proefopzet waarbij de proefdieren minder ongerief ondervinden (verfijning), verkregen kunnen worden, dan zal de DEC negatief adviseren en wordt de voorgenomen dierproef niet uitgevoerd.

Op 18 december 2014 is de gewijzigde Wet op de Dierproeven (WoD) in werking getreden. Hierdoor zijn de procedures voor het verkrijgen van toestemming voor het uitvoeren van een dierproef sterk gewijzigd. Er zijn nieuwe instellingen opgericht, namelijk de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) op landelijk niveau, en de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) op instituutniveau.



De IvD is een belangrijke schakel tussen de DEC/CCD enerzijds en de onderzoeker. De IvD-BPRC bestaat uit de beheerder van de fokkolonie, een wetenschapper, een dierenarts en een biotechnicus, allen werkzaam bij het BPRC. Verder zijn een dierenarts met kennis van proefdiergeneeskunde, ook werkzaam bij BPRC, en een externe proefdierdeskundige betrokken als adviseurs. De missie van de IvD-BPRC is om in alle opzichten naar een optimaal welzijn van onze proefdieren te streven, uitgaande van de principes van de 3V's (Vervanging, Vermindering en Verfijning), de intrinsieke waarde van de dieren en de actuele wettelijke bepalingen. Verder bewaakt de IvD-BPRC de correcte praktische uitvoering van de dierexperimenten op de werkvloer.

De gewijzigde WoD schrijft voor dat een experiment waarbij proefdieren ingezet worden pas mag worden uitgevoerd wanneer de CCD hiervoor een "projectvergunning" aan de vergunninghouder heeft afgegeven. Voorafgaand aan het indienen van een projectvergunningsaanvraag bij de CCD wordt deze door de IvD beoordeeld op helderheid, logische opbouw en of het project uitvoerbaar is binnen het instituut. Vervolgens wordt de projectvergunningsaanvraag door de CCD voorgelegd aan een door de CCD gekozen DEC, die hierover advies uitbrengt aan de CCD.

Deze gewijzigde procedure geldt voor alle *nieuwe* aanvragen. Nu zijn er echter ook nog aanvragen waarvoor voor het in werking treden van de gewijzigde WoD al toestemming was verleend. Deze kunnen nog worden uitgevoerd tot uiterlijk 31 december 2017, waardoor er nu sprake is van een overgangssituatie.

Een deel van de reeds goedgekeurde aanvragen betreft overkoepelende aanvragen voor meerdere studies ("paraplu aanvragen"). Na toekenning van zo'n paraplu aanvraag dient voor elke afzonderlijke studie een gedetailleerd "werk-protocol" te worden ingediend. Dit werk-protocol werd onder de oude wetgeving door de DEC beoordeeld, maar sinds de oprichting van de IvD worden ze door de IvD beoordeeld. De IvD beoordeelt tevens aanpassingen in bestaande projectvergunningen. Indien bij een aanpassing sprake is van een toename in de mate van ongerief voor het dier, of het aantal benodigde dieren toeneemt, of indien het niet duidelijk is of de aanpassing binnen het kader van de projectvergunning valt dan wordt deze aanpassing voorgelegd aan de DEC.

Gezien de complexiteit van de overgangssituatie hebben we de diverse procedures samengevat.

Trajecten onderzoeksaanvragen na de gewijzigde WoD

Paraplu aanvragen waarover voor 18 december 2014 al positief geadviseerd was.

1. Werk-protocollen worden voorgelegd aan de **IvD** => als de IvD positief adviseert dan kan overgegaan worden tot uitvoering van het experiment.

Mochten er aanpassingen nodig zijn in de bestaande paraplu aanvraag dan worden deze beoordeeld door de IvD. Indien deze aanpassingen een toename van mate van ongerief of van het aantal dieren betreffen, of dat het niet duidelijk is dat de aanpassingen binnen het kader van het project vallen dan worden ze beoordeeld door de DEC.

Nieuwe aanvragen (situatie per 01-01-2018)

1. Aanvraag voorleggen aan de **IvD** voor beoordeling op helderheid en technische uitvoerbaarheid
2. Na verwerking van de feedback de aanvraag indienen bij de **CCD**
3. CCD kiest een **DEC** en legt de aanvraag daar voor ter advies
4. DEC brengt advies uit aan de CCD
5. **CCD** besluit over het afgeven van een "projectvergunning"

Na een eventueel positief besluit kunnen aanvragen ingediend worden voor afzonderlijke dierproeven ("werk-protocollen") bij de IvD => als de IvD positief adviseert dan kan overgegaan worden tot uitvoering van het experiment.

Mochten er aanpassingen nodig zijn in de projectvergunning dan worden deze beoordeeld door de IvD. Indien deze aanpassingen een toename van mate van ongerief of van het aantal dieren betreffen, of dat het niet duidelijk is dat de aanpassingen binnen het kader van het project valt dan worden ze beoordeeld door de CCD.

2

Nieuwe aanvragen ingediend bij CCD, voor een projectvergunning.

3

Aanvragen ingediend bij CCD, voor een aanpassing in een al eerder goedgekeurde paraplu aanvraag.

10

De IvD heeft in 2016 tien werkprotocollen voor studies met experimentele handelingen ontvangen.

Aantallen DEC en IvD aanvragen

In 2016 zijn er twee nieuwe aanvragen voor een projectvergunning ingediend bij de CCD. Over beide aanvragen heeft de DEC-BPRC een positief advies uitgebracht aan de CCD, waarna door de CCD een projectvergunning is afgegeven.

In totaal werd er in 2016 drie keer een aanvraag ingediend voor een aanpassing in een al eerder goedgekeurde paraplu aanvraag. Hierover werd in alle gevallen een positief advies uitgebracht, in twee gevallen na aanvullende vragen van de DEC.

De IvD heeft in 2016 tien werkprotocollen voor studies met experimentele handelingen ontvangen. Over alle werkprotocollen is uitvoerig met de onderzoekers gediscussieerd voordat goedkeuring verleend werd. Negen werkprotocollen vielen onder paraplu aanvragen die waren goedgekeurd voor 18 december 2014 en één werkprotocol viel onder een nieuwe goedgekeurde CCD projectvergunning.

Binnen BPRC wordt ook veel gedragsonderzoek gedaan. De IvD beoordeelt vooraf of deze studies onder de drempel van een dierproef blijven. Achteraf wordt met alle betrokkenen, inclusief de diervverzorgers, geëvalueerd of het welzijn van de dieren niet is aangetast tijdens de gedragsstudies.

Huisvesting en verzorging

Ten behoeve van het onderzoeksprogramma heeft het BPRC eigen fokkolonies van resusapen (*Macaca mulatta*), Java-apen (*Macaca fascicularis*) en marmoset-apen (*Callithrix jacchus*).



Resusaap



Java-aap



Marmoset-aap

In deze fokkolonies zijn in 2016 102 dieren geboren bij de resusapen, 24 bij de Java-apen en 50 bij de marmosets. Het BPRC heeft een actief fokbeleid, waarbij gestreefd wordt naar een stabiele kolonie met inachtnaam van het onderzoeksprogramma. Er is mede daarom nauwe samenwerking tussen de Animal Science Department -de verantwoordelijke afdeling voor het huisvesten en verzorgen van de dieren- en de diverse onderzoeksgroepen. De Java-apen kolonie wordt grotendeels beheerd voor het wetenschappelijk onderzoek naar gedragsaspecten in samenwerking met de afdeling Dierecologie van de Universiteit van Utrecht.

Om de fok optimaal te laten verlopen, inteelt te voorkomen en de best mogelijke selectie van dieren voor het onderzoek te waarborgen werken de koloniemanager (gedragsdeskundige), dierenartsen en genetici nauw samen. In de fok zijn de dieren gehuisvest in grote groepen. De dieren blijven in principe minimaal gedurende de eerste 1½ (marmosets) of 3½ (makaken) jaar van hun leven in hun geboortegroep. Op deze wijze probeert het BPRC de natuurlijke patronen zo veel mogelijk na te bootsen. Een aantal dieren blijft gedurende hun hele leven in de fokgroep. Zodra dieren geselecteerd worden voor studies verhuizen de dieren naar daartoe geschikte faciliteiten. Ook daar worden de dieren sociaal gehuisvest en is er veel aandacht voor verrijking van de leefomgeving om verveling te voorkomen. Daarnaast is er specifieke aandacht voor diertraining om dieren zo veel mogelijk vrijwillig mee te laten werken tijdens de studies. Het BPRC heeft twee ervaren diertrainers in dienst.

Het optimaal verzorgen van deze grote groepen apen met een grote diversiteit aan leeftijden vereist specifieke expertise. De dieren worden verzorgd door gediplomeerde dierverzorgers. Zij hebben een meerjarige opleiding gevolgd met daarna een interne opleiding om de specifieke kenmerken van apengedrag en verzorging te leren.

Diertraining en welzijn

Het BPRC houdt zich al een aantal jaren bezig met diertraining gericht op het zo veel mogelijk vrijwillig mee laten werken van de dieren aan een aantal handelingen. Dit voorkomt stress tijdens experimenten, wat zowel dierenwelzijn als het onderzoek ten goede komt. Ook voorkomt training verveling en stereotype gedrag. De diertrainers van het BPRC ontwikkelen methoden om dit zo optimaal mogelijk te laten verlopen en zijn ook in internationaal verband betrokken bij nieuwe ontwikkelingen. De kennis die ze ontwikkelen wordt gedeeld en uitgedragen naar andere instituten, o.a. door het geven van lezingen of workshops.

Diergeneeskunde



Samenstelling groep
diergeneeskundige
zorg:

3 dierenartsen
(4 in 2017)

1 veterinaire patholoog

5 ondersteunende
medewerkers

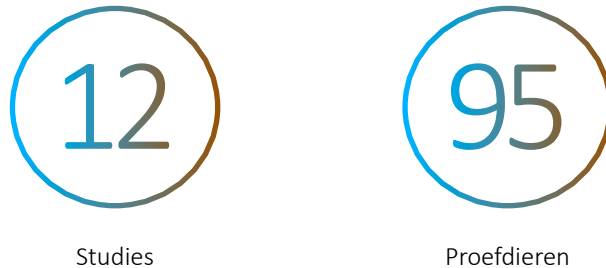
De groep diergeneeskundige zorg is verantwoordelijk voor de controle op de gezondheid van alle dieren, zowel in de fok als in studies. Om gezondheids- en gedragsproblemen bij de dieren goed te monitoren werken de dierenartsen, koloniemanager en diertrainers nauw samen. Daar waar mogelijk werkt het diergeneeskundige team aan verfijning van verschillende methoden, zoals verbeteren van de verdoving en pijnstilling die gegeven wordt tijdens operaties. Daarnaast is het BPRC bezig om vroegtijdig diabetes in Java-ape, dat van nature voorkomt, op te sporen en wordt gewerkt aan het in kaart brengen van de verschillende micro-organismen die de verschillende soorten ape bij zich dragen en die mogelijk van invloed kunnen zijn op studies.

Ethologie

Ons ethologisch onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met de Universiteit Utrecht. Het (niet-invasieve) fundamentele onderzoek richt zich op de evolutie van sociaal gedrag van primaten, ook in vergelijking met dat van de mens. Belangrijke onderzoekslijnen hierbij zijn seksueel gedrag, vriendschapsbanden, samenwerking, intelligentie en communicatie. Hierbij speelt de sociale capaciteit van de onderzochte soorten een belangrijke rol. Het kunnen omgaan met verschillende niveau's van complexiteit is een belangrijk aspect in de evolutie van de intelligentie van primaten.

Details dierexperimenteel onderzoek

In totaal werden er in 2016 12 studies bij het BPRC verricht waarbij in totaal 95 proefdieren ingezet zijn.



Meer specifiek zijn er 65 resusapen ingezet in 8 studies, 14 Java-apen in 2 studies, en 16 marmosets in 2 studies.

Bij het BPRC worden experimenten verricht die de volgende doelen dienen: toegepast translationeel onderzoek (preklinisch onderzoek zoals de ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen) en fundamenteel wetenschappelijk onderzoek (met als doel een antwoord te krijgen op wetenschappelijke vragen; hier wordt bijvoorbeeld ook het onderzoek naar het gedrag van apen onder gecategoriseerd). Tabel 1 geeft weer hoeveel dieren voor de verschillende onderzoeksdoelen zijn ingezet.

Doelen	Resusapen	Java-apen	Marmosets
Toegepast translationeel onderzoek	55	0	16
Fundamenteel wetenschappelijk onderzoek	10	14	0

Tabel 1. Aantallen ingezette dieren per doel.

Ongerief

Een belangrijke factor voor het advies dat de IvD en de DEC geven, is het te verwachten ongerief voor de ingezette proefdieren (zie: *Dierexperimenten Commissie*). Daarnaast houden de IvD en de DEC bij het bepalen van het advies ook rekening met de duur van het ongerief. Beiden zijn afhankelijk van de aard van het experiment. Hoe hoger en langer het te verwachten ongerief, des te zwaarwegender moeten de wetenschappelijke en volksgezondheid belangen zijn om het experiment te mogen uitvoeren. Ondanks dat ongerief moeilijk te kwantificeren is worden de volgende categorieën gebruikt (Annex VIII van directive 2010/63/EU):

Licht

zoals enkele bloedafnames,
maar ook onnatuurlijke
huisvesting

Matig

zoals vaccinaties
en milde ziekte-
verschijnselen

Ernstig

zoals ernstige
ziekteverschijnselen

In tabel 2 is per diersoort het ontvangen ongerief gespecificeerd.

Ontvangen ongerief	Resusapen	Java-apen	Marmoset-apen
Licht	39	4	0
Matig	26	10	16
Ernstig	0	0	0

Tabel 2. Ingeschat ongerief ondergaan door ingezette dieren.

Immunobiologie

Binnen de afdeling Immunobiologie wordt voornamelijk onderzoek gedaan naar ziektemechanismes en mogelijke behandelingen van multiple sclerose (MS). MS is een chronische ziekte waarbij het centrale zenuwstelsel wordt aangetast, wat uiteindelijk kan leiden tot blijvende invaliditeit. Er zijn wel medicijnen op de markt maar deze werken niet in alle patiënten, hebben soms ernstige bijwerkingen en kunnen de uiteindelijke progressie van de ziekte niet voorkomen. De oorzaak van MS is nog onbekend maar het is wel duidelijk dat een ontregeld immuunsysteem hier een belangrijke rol bij speelt. Door dit ziekteproces na te bootsen in de marmoset ontstaat een diermodel (EAE¹) dat belangrijke overeenkomsten vertoont met MS, meer dan de veel gebruikte EAE modellen in muizen of ratten.



EAE staat voor
Experimental
autoimmune
encephalomyelitis

Wij zetten de dieren in om zowel ziektemechanismen als om mogelijke nieuwe behandelingen te onderzoeken. In de laatste jaren hebben we het ongerief voor de dieren in studies sterk verminderd. Deze verfijning heeft echter ook een keerzijde, want het blijkt dat het ziektemodel daarmee gevoeliger is geworden voor kleine veranderingen in omgevingsfactoren. Na een verandering in het dieet van de dieren nam bijvoorbeeld de reproduceerbaarheid van de experimenten af. Deze verminderde reproduceerbaarheid tast therapie studies aan, aangezien nu voor statistische toetsing van de resultaten aanzienlijk meer dieren per groep nodig zijn. Dit staat uiteraard op gespannen voet met de 3V's, met name de Vermindering van het aantal gebruikte dieren in experimenten.

Om te onderzoeken of de verandering in het dieet direct gevolgen heeft gehad voor de reproduceerbaarheid van de experimenten, hebben we een studie uitgevoerd in tweeling marmosets. De helft van iedere tweeling bleef op het huidige dieet en de andere helft op het dieet zoals dit jaren geleden werd gegeven. Het bleek dat meer dieren EAE symptomen ontwikkelden wanneer ze het oude dieet kregen. Tevens is onderzocht of het dieet een invloed heeft op de darmflora en het blijkt dat de darmflora ook verandert onder invloed van het dieet. Er wordt nu verder onderzoek gedaan naar de rol van deze veranderende darmflora met betrekking tot EAE.

Het nieuwe dieet heeft in de fokkolonie een aantal positieve effecten en daarom zullen de marmosets op dit dieet blijven. Ruim voor aanvang van een nieuwe studie zal het dieet van de geselecteerde dieren veranderen naar het 'oude' dieet om de reproduceerbaarheid intact te houden.

Virologie

Binnen de afdeling Virologie wordt onderzoek gedaan met als doel ontwikkeling van geneesmiddelen en vaccins voor verschillende voor de mens gevaarlijke virale infecties. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen seksueel overdraagbare (chronische) virale infecties (*HIV*), respiratoire virale infecties (*Influenza*) en virussen die door insecten, zoals vliegen, teken en muggen, worden overgedragen. Deze laatste groep virussen (zgn. Arbo virussen) bevat klinisch belangrijke virussen zoals *gele koorts virus*, *Chikungunya virus*, *Rift Valley Fever virus*, *Japanse encefalitis virus*, *West Nijl virus*, *dengue virus* en het recent veel besproken *Zika virus*.

Seksueel overdraagbare virussen

Ondanks de sterk verbeterde medicijnen zijn er in 2016 naar schatting 1 miljoen mensen overleden aan de gevolgen van een HIV infectie. Een vaccin dat beschermt tegen HIV infectie zou een enorme stap vooruit zijn.

In 2016 liepen er een tweetal HIV vaccinstudies welke doorlopen tot in 2017. In de eerste studie wordt in samenwerking met onderzoekers van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam een experimenteel HIV vaccin getest. Dit is een zogenaamde effectiviteitstudie. Naast het in kaart brengen van de immuunresponsen, wordt ook gekeken naar de effectiviteit van de opgewekte immuunresponsen. Dit gebeurt door de dieren een HIV-achtig virus toe te dienen en te analyseren of het vaccin beschermt tegen infectie. De tweede studie is een immunogeniciteitsstudie. Dit betekent dat er een zeer gedetailleerde analyse wordt uitgevoerd van de immuunresponsen die door het vaccin worden opgewekt. Deze studie is onderdeel van een omvangrijk consortium gesubsidieerd door de EU. De resultaten van beide studies zullen in de loop van 2017 bekend worden.

Respiratoir overdraagbare virussen

Infecties met het influenza virus resulteren wereldwijd jaarlijks in zo'n 3 tot 5 miljoen ernstig zieken en kosten tussen de 250 duizend en 500 duizend mensenlevens. Griepvaccinatie kan zowel het aantal ziektegevallen als de ernst van de infectie sterk terugdringen. Met nieuwe vaccins kunnen naar verwachting nog betere resultaten behaald worden.

In 2016 zijn we gestart met een immunogeniciteit-/effectiviteitstudie waarbij potentiële influenza vaccins worden getest. Deze studie wordt uitgevoerd in samenwerking met meerdere Europese partners en wordt gesubsidieerd door de EU. Ook hier geldt dat de resultaten in 2017 bekend zullen worden.



Lees meer over
deze studie op
onze website.

Muggen-overdraagbare virussen

De huid is het grootste orgaan en doorgaans een effectieve barrière tegen ziekteverwekkers uit onze leefomgeving. Muggen zijn echter in staat om deze barrière te doorbreken. Voor een bloedmaaltijd maken zij een gaatje in de huid om op zoek te gaan naar een klein bloedvat. Om te voorkomen dat het bloed meteen stolt spugen ze een kleine hoeveelheid speeksel uit. Dit speeksel kan verschillende ziekteverwekkende parasieten en virussen bevatten.



De tijgermug (*Aedes aegypti*) kan door een beet diverse virussen overbrengen, zoals dengue, gele koorts, Rift Valley fever, Chikungunya virus en het Zika virus.

Wereldwijd sterft 1 op de 17 mensen aan de indirecte gevolgen van een muggenbeet. Het overgrote deel door de malariaparasiet, maar muggen-overdraagbare virussen als het West Nijl virus, dengue virus, gele koorts virus, Chikungunya virus en het Zika virus, winnen snel terrein.

In de afgelopen jaren heeft de afdeling Virologie veel kennis opgedaan via experimentele infecties van makaken met het West Nijl virus dat encefalitis (hersenontsteking) kan veroorzaken (in 2014), en met het dengue virus, de veroorzaker van knokkelkoorts (in 2015). De recente uitbraak van het Zika virus in Zuid-Amerika heeft laten zien hoe groot de impact kan zijn op zowel sociaal als economisch vlak. Dit heeft ons ertoe gebracht om ook een Zika infectiemodel in resusapen op te zetten. Een zestal dieren werden geïnfecteerd met het Zika virus. In het bloed van de dieren vonden wij een hoeveelheid virus vergelijkbaar met dat in geïnfecteerde personen. Na 1 tot 2 weken was het virus weer uit de bloedcirculatie verdwenen. De apen kregen, net als bij de meeste geïnfecteerde personen, geen duidelijke klinische verschijnselen.

Het verwerken en analyseren van verschillende verzamelde weefsels loopt door tot in 2017. Met gebruik van dit Zika infectie model kunnen nu ook potentiële Zika vaccins en geneesmiddelen getest worden op hun werkzaamheid.

***In vitro* onderzoek muggen-overdraagbare virussen**

Infecties met muggen-overdraagbare virussen worden gekenmerkt door een grote variatie in ziekteverloop. De meeste mensen hebben geen klinische klachten, zo'n twintig procent van de geïnfecteerde personen krijgt milde tot zeer ernstige klachten, en een klein deel van de geïnfecteerden overlijdt aan deze infecties. Tot nu toe is er weinig bekend over de gecompliceerde interactie tussen de mug, het virus en de mens. Vroege gebeurtenissen na infectie kunnen een belangrijke rol spelen in de verspreiding van het virus van de huid naar andere organen, en zo het ziekteverloop beïnvloeden.



In vivo betekent:
In een levend lichaam

In vitro betekent:
In glas (letterlijk),
ofwel, in een labschaal,
zonder levend lichaam.

Bij eerder genoemde *in vivo* onderzoeken lag de focus op hoe het virus zich via het bloed door het lichaam verspreidt. Daarnaast is de interactie onderzocht tussen het virus en het zogenaamde systemische immuunsysteem, de afweercellen in het bloed. In 2016 heeft de afdeling Virologie geïnvesteerd in het opzetten van een zogenaamd huid explant model.

Wat speelt er zich direct na de muggenbeet af in de huid? Door middel van *in vitro* kweektechnieken is er in 2016 een begin gemaakt om deze vraag te beantwoorden. Hiervoor worden huidbiopten van donorapen geïnfecteerd met muggen-overdraagbare virussen. De vroege voortgang van de infectie wordt zichtbaar gemaakt met moderne immunohistochemische kleuringen en moleculaire technieken. Momenteel zijn we bezig om deze technieken te optimaliseren en te standaardiseren. Hiermee hopen we inzicht te krijgen in het ziekteverloop van muggen-overdraagbare infecties waarmee nieuwe behandelmethoden ontwikkeld zouden kunnen worden.

Virale diagnostiek

Naast onze onderzoekswerkzaamheden komen er ieder jaar opnieuw meer aanvragen binnen voor onze diagnostische service unit. Dierentuinen, opvangcentra en onderzoekscentra uit binnen- en buitenland doen een beroep op deze unit voor virusbepalingen in bloedmonsters van hun apen. Onze expertise op dit gebied wordt wereldwijd erkend, en wij hopen zo bij te kunnen dragen aan een goede gezondheid van apen wereldwijd.

Parasitologie

Binnen de afdeling Parasitologie wordt gewerkt aan *malaria* en *tuberculose*. Malaria is een tropische ziekte die wordt veroorzaakt door de malariaparasiet. Deze parasiet, die wordt overgebracht door muggen, maakt voornamelijk slachtoffers in de minder ontwikkelde landen in de tropen en subtropen en eist tot wel 500.000 dodelijke slachtoffers per jaar. Nieuwe, goedkope geneesmiddelen en optimaal werkzame vaccins zijn hard nodig om de ziekte verder terug te dringen en in de verdere toekomst helemaal uit te roeien.

Wij doen onderzoek naar slapende malariaparasieten in de lever. Slapende parasieten komen voor bij een kleine groep van malariaparasieten, die alleen mensen en apen besmetten. Malaria parasieten die bijvoorbeeld muizen of vogels besmetten maken geen slapende parasieten aan. Van slapende parasieten wordt je niet ziek, maar ze kunnen zich ontwikkelen en opnieuw ziekte veroorzaken. Om onderzoek te doen naar slapende parasieten maken wij gebruik van malariaparasieten die apen besmetten. In het verleden hebben wij een reageerbuis kweekmodel (*in vitro*) ontwikkeld voor de slapende parasieten van een apenmalaria in levercellen. Hiermee kunnen we mogelijk nieuwe geneesmiddelen die slapende stadia doden onderzoeken, waarbij we één aap nodig hebben als donor van parasieten, omdat we de malariaparasiet in het bloed niet in een reageerbuis kunnen kweken. De parasiet uit het bloed is nodig om muggen te besmetten, waar we dan parasieten uithalen om de leverkweken te besmetten.



Malariamuggen (*Anopheles stephensi*) drinken met malaria besmet bloed afkomstig van een donoraap.

In 2016 zijn we verder gegaan met het onderzoek naar schaalvergroting van ons reageerbuis lever kweekmodel van de slapende parasieten, waardoor we met parasieten uit de donoraap veel meer mogelijke geneesmiddelen kunnen testen dan tot nu toe het geval is. Dit onderzoek blijkt complexer dan verwacht en loopt ook nog door in 2017, maar zal naar verwachting resulteren in efficiënter gebruik van parasieten uit de aap.

Daarnaast hebben we in 2016 grootschalige leverstadium parasiet kweken gebruikt om specifiek zoveel mogelijk slapende parasieten te zuiveren. Deze gezuiverde parasieten zijn gebruikt om genetisch materiaal uit te isoleren en met behulp daarvan vast te stellen uit welke bouwstenen de slapende parasieten bestaan. De informatie die uit dit onderzoek gaat komen wordt gebruikt bij het meer gericht ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Alle parasiet donorapen die voor dit onderzoek nodig zijn worden, na bloedafname, genezen van malaria en keren daarna terug naar de kolonie.



Mtb staat voor
Mycobacterium
tuberculosis

Tuberculose, kortweg TB, of in de volksmond en in het verleden ook wel “de toring” genoemd, is een ernstige bacteriële infectieziekte die wordt veroorzaakt door *Mtb*, of nauw verwante bacteriesoorten. Infectie met de bacterie verloopt in de meeste gevallen zonder symptomen en er zijn naar schatting wereldwijd zo’n 2 miljard (!) mensen drager van de infectie (latent geïnfecteerd). Zolang zij niet ondervoed of qua afweer verzwakt raken, worden zij niet ziek. Maar wanneer de ziekte wel optreedt en niet wordt behandeld, heeft TB in circa de helft van de gevallen een dodelijke afloop. De Wereldgezondheidsorganisatie, WHO, schatte dat er in 2015 nog steeds circa 1,8 miljoen mensen overleden zijn aan de gevolgen van TB. Dat is 1 dode per 18 seconden en daarmee is TB, althans numeriek, de meest bedreigende infectieziekte wereldwijd.



2 Miljard
mensen wereldwijd
zijn drager van de
TB bacterie.



1,8 Miljoen
mensen stierven
aan de gevolgen
van TB in 2015.



Dit is 1 dode
per 18 seconden.



De tuberculosebacterie is een behoorlijk complex organisme met een bijzondere celwand en wel 4000 genen in het erfelijk materiaal. Hij heeft zich over duizenden jaren zeer goed aanpast aan de mens als gastheer. Zoals ook uit het voorgaande blijkt, omzeilt de bacterie in veel gevallen het afweersysteem van zijn gastheer succesvol en houdt zich zodoende vaak jarenlang in het lichaam schuil (latente infectie). Er zijn antibiotica beschikbaar tegen TB, maar in tegenstelling tot wat bij andere bacteriële infecties gebruikelijk is, moet een kuur minstens 6 maanden en soms langer worden gevolgd om doeltreffend te zijn. Helaas heeft langdurige antibioticum-behandeling aanzienlijke bijwerkingen tot gevolg (leverschade, blindheid en dergelijke). Het steeds veelvuldiger vóórkomen van (meervoudig) antibioticum-resistente stammen trekt een zware wissel op de behandeling van TB. Het ontwikkelen van nieuwe antibiotica en/of therapieën die beter werkzaam zijn en die de duur van de behandeling kunnen verkorten, zijn dan ook dringend gewenst.

Beter nog dan behandelen, is het voorkomen van TB. In dat licht is preventieve vaccinatie het goedkoopste en meest effectieve middel om verdere verspreiding van TB tegen te gaan. Paradoxaal genoeg is het enig beschikbare vaccin tegen TB, het BCG vaccin, één van de oudste vaccins ter wereld: het wordt sinds 1921 in mensen gebruikt. Het werkt redelijk goed op jonge leeftijd en wereldwijde BCG vaccinatieprogramma's sparen naar schatting ruim 100.000 kinderlevens per jaar. Maar zoals uit eerdergenoemde cijfers ook blijkt, werkt BCG uiteindelijk onvoldoende om TB op wereldschaal terug te dringen. Om die epidemie het hoofd te bieden, zijn ook dringend nieuwe TB vaccins nodig.



BCG staat voor
Bacille Calmette-Guérin

Ondanks jarenlang onderzoek en mede vanwege de complexe interactie tussen de bacterie en zijn gastheer moeten we spijtig genoeg constateren dat we nog steeds niet goed begrijpen hoe beschermende afweer tegen TB tot stand komt. Of, omgekeerd: we begrijpen onvoldoende wanneer onze afweer faalt en een TB infectie ernstig verloopt. Bij gevolg moet bij de ontwikkeling van nieuwe preventieve en therapeutische behandelmethodes proef-ondervindelijk (empirisch) worden vastgesteld of iets beter werkt. Klinische tests zijn echter tijdrovend en de infrastructuur voor klinisch TB onderzoek is zeer schaars. Daarnaast is het onveilig en dus uitgesloten dat mensen aan een experimentele TB infectie worden onderworpen om de werkzaamheid van nieuwe behandelmethodes vast te stellen. En omdat afweer (immunologie), pathologie en fysiologie zó complex zijn dat er ook geen laboratoriumtests voorhanden zijn, is het gebruik van proefdieren op enig moment in het ontwikkelingsproces onvermijdelijk.

Apen, en in dit geval makaken, worden veel gebruikt voor tuberculose onderzoek. Ze zijn van nature gevoelig voor de *Mtb* infectie, vertonen een uitzonderlijk grote gelijkenis qua ziekteontwikkeling, en het afweersysteem vertoont in al zijn facetten zeer grote overeenkomsten met dat van de mens. Op grond daarvan wordt aan het experimentele onderzoek in makaken een grote voorspellende waarde voor klinische uitkomst toegekend. Tot op heden zetten we in ons instituut dieren voornamelijk in om (nieuwe) vaccinatie-strategieën tegen TB te bestuderen. Ofschoon we geen eigen kandidaat-vaccin hebben, werken we met diverse partners en veelal in grotere internationale netwerken samen. In samenwerkingsverband worden diverse strategieën uitgewerkt om BCG te vervangen of het te versterken met een vervolgvaccinatie. Binnen de EU onder het huidige Horizon 2020 programma; onder aanvoering van de Bill & Melinda Gates Foundation binnen het Collaboration for TB Vaccine Discovery en met Aeras Foundation uit de Verenigde Staten.

Voor het jaar 2016 hebben onze activiteiten zich voornamelijk toegespitst op het verder verfijnen van ons model. Voorheen werden dieren geïnfecteerd met een relatief hoge dosis (doorgaans 500 bacteriën) wat tot progressieve ziekte leidt. Deze ziekteontwikkeling konden we met (experimentele en BCG controle) vaccinatie terugdringen en zodoende dus werkzaamheid aantonen. Hiermee is een relatief korte duur van het experiment gegarandeerd en het ongerief voor de dieren in elk geval in de tijd beperkt. Onze huidige aanpak is erop gericht om vast te stellen dat we binnen een vergelijkbaar kortdurende infectiefase ook met een lagere infectiedosis, meer vergelijkbaar met hoe

mensen over het algemeen geïnfecteerd raken, de ontwikkeling van TB en daarmee de eventuele werkzaamheid van preventieve vaccinatie kunnen vastleggen.

We hebben in totaal 10 resusapen en 10 Java-apen gebruikt om in een zogenaamde dosis-escalatiestudie vast te stellen dat beide soorten gelijkelijk gevoelig zijn voor *Mtb* infectie. Bij besmetting met slechts enkele of zelfs maar één mycobacterie ontwikkelden beide makaaksoorten aantoonbaar TB. Daarbij bleken resusapen iets meer weefselschade te vertonen dan Java-apen. Verder onderzoek heeft aangetoond welke immunologische reactiepatronen samenhangen met deze verschillende gevoeligheid voor TB. Onze bevindingen lijken te passen bij de observatie dat op langere termijn Java-apen in de helft van de gevallen een latente TB infectie ontwikkelen. Beide apensoorten kunnen dus voor verschillende vragen en doelstellingen worden ingezet.

Nu we hebben aangetoond waar de ondergrens voor minimale TB infectie in makaken ligt, kunnen we proberen of herhaalde lage dosis infectie in een beheersbare proefopzet kan worden nagebootst. Herhaalde infectie in relatief korte tijd is waarschijnlijk een natuurgetrouwere weergave van wat er in werkelijkheid bij infectie van de mens gebeurt. Ons verfijningsprogramma zal in 2017 worden voortgezet in een studie met resusapen om te bepalen of bij herhaalde minimale besmetting evenzeer een mildere vorm van TB kan worden geïnduceerd, wat we in elk geval met controle BCG vaccinatie kunnen terugdringen. Indien succesvol, dan kunnen we voortaan preventieve vaccinatie niet alleen evalueren op het vermogen om ziekte terug te dringen, maar ook om infectie te voorkomen.

Tot slot, en met hetzelfde doel om het TB onderzoeksmodel te verfijnen, hebben we in 2016 onze experimentele dierfaciliteit uitgebreid met de installatie van een geavanceerde, geïntegreerde scanner voor positron-emissie tomografie (PET) en computer tomografie (CT): zie ook **uitgelicht**. In samenwerking met de producent, met een expertise groep uit Pittsburgh in de VS, en met steun van de Europese Commissie (Horizon 2020 / TBVI) en de BMGF binnen haar CTVD netwerk, zullen we deze PET/CT technologie ook in 2017 verder gebruiken. Waar conventionele röntgen-diagnostiek relatief ongevoelig is gebleken, hopen we met PET/CT ook in de loop van de infectiefase, en niet alleen op eindpunt, een beter inzicht te krijgen in de ontwikkeling van de ontstekingsreactie van de gastheer (PET) en van de pathologie (met de op röntgen-techniek gebaseerde CT).

PET/CT beeldvorming en diagnostiek in TB onderzoek

Wanneer iemand zich ziek meldt bij een arts, zal deze moeten zien te achterhalen wat er mankeert. Daarbij zal de arts vaak aan de hand van indirecte meetgegevens - van buiten het lichaam en al dan niet gesteund door bloed-, urineonderzoek en dergelijke - proberen vast te stellen wat de oorzaak van de ziekte is. Maar als bevestigd moet worden welke organen of weefsels zijn aangetast, dan grijpt de arts in veel gevallen naar 'beeldvormende technieken'. Een bekend voorbeeld van zo'n beeldvormende techniek is een röntgenopname. Deze beeldvormende technieken kunnen voorkomen dat de patiënt in kwestie moet worden opengesneden om, met een zogenaamde kijkoperatie, met zekerheid de diagnose te stellen.

Bij onderzoek naar ziekten en de werking van mogelijk nieuwe therapieën in apen is het - net als bij het stellen van een diagnose bij mensen - zaak om de aard en de mate van ziekte in kaart te brengen. En het liefst van buiten het lichaam (non-invasief) en op herhaalde momenten in de tijd, dus zonder snij- en/of kijkoperaties. Ook bij proefdieronderzoek in apen zijn beeldvormende technieken in veel gevallen een uitkomst.

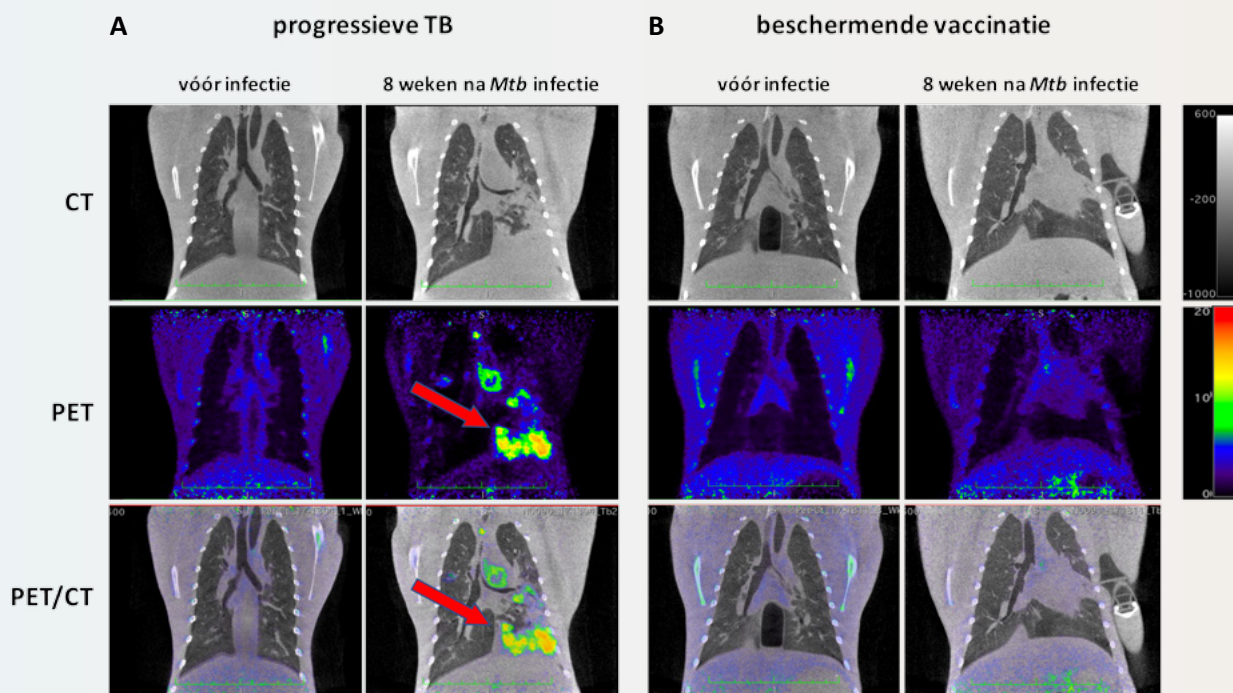
Bij tuberculose infectie (TB) treedt er na verloop van tijd schade aan het longweefsel op in de vorm van granulomateuze lesies (ook wel tuberkels genaamd: dit zijn grote onstekingshaarden). Voor TB diagnostiek worden mensen vanouds in een röntgenapparaat onderzocht om vast te stellen of zij long-granuloma's hebben. Op vergelijk-

bare wijze maken we ook van de röntgentechniek gebruik bij ons TB onderzoek in apen.

Een klassieke röntgenopname maakt van een 3-dimensionale long een 2-dimensionaal plaatje. Daarbij gaat een deel van de informatie over de wefelschade dus verloren. Inmiddels is er een 3-dimensionale röntgentechniek beschikbaar, waarbij met behulp van een speciale opstelling de patiënt rondom wordt gescand en met behulp van een computer een 3-dimensionale reconstructie wordt gemaakt. Deze techniek wordt kortweg CT (computed tomography) genoemd.

Röntgen en CT geven, door de breking van straling te registreren, informatie over de structuur van weefsel. Andere beeldvormende technieken zijn echter meer geschikt om informatie over het functioneren van een orgaan of weefsel te geven. Eén van deze technieken is de zogenaamde positron-emissie tomografie, kortweg PET genoemd.

PET maakt gebruik van het vrijkomen van zogenaamde positronen (sub-atomaire deeltjes) na het verval van een radioactief isotoop. Door zo'n isotoop te koppelen aan een signaalstof die zich ophoopt in een bepaald orgaan of een (afwijkende) weefselstructuur, wijzen de positronen eigenlijk aan waar de schade zich bevindt. (Technisch gesproken: de plek waar lichtdeeltjes van 511 kilo elektronvolt vrijkomen nadat een positron en een



Afbeelding 1: PET/CT opnames voor en na experimentele infectie van een resusaap met *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

A. Acht weken na *Mtb* infectie is er co-lokalisatie van een CT signaal dat wijst op granuloma vorming en een relatief sterk PET signaal van ingevangen radioactief suiker dat een lokale ontstekingsreactie verraadt.

B. Ofschoon op hetzelfde moment eenzelfde dosis *Mtb* in de linker longkwab is ontvangen, is door de beschermende werking van een eerdere vaccinatie 8 weken na primaire infectie geen PET/CT signaal waar te nemen.

electron als vanzelf op elkaar botsen, kunnen in een scanner worden geregistreerd). Bij kankerdiagnostiek in de mens wordt gebruik gemaakt van PET, en van radioactief fluor (^{18}F) en een suiker molecuul als signaalstof. Zoals deze suiker zich ophoopt in een tumor waar cellen snel delen, zo hoopt het zich ook op waar een tuberculose-geassocieerde ontstekingsreactie plaatsvindt en kan een longgranuloom met PET/CT zichtbaar worden gemaakt.

Gesteund door een projectsubsidie van de Bill & Melinda Gates Foundation heeft het BPRC in de loop van het jaar 2016 een geïntegreerde PET/CT camera in haar

experimentele faciliteit geïnstalleerd. De PET/CT scanner is een nieuw type dat door de fabrikant speciaal is ontworpen voor preklinisch onderzoek. Protocollen en procedures zijn voor de specifieke toepassing van TB diagnostiek opgesteld en worden in 2017 verder getest en geoptimaliseerd. Inmiddels hebben we eerste opnames van TB in experimenteel geïnfecteerde resusapen gemaakt die veelbelovend zijn. In de bijgaande afbeelding is 8 weken na infectie een duidelijk verschil te zien tussen progressief voortschrijdende weefsel schade en ontsteking in de linker longkwab van het ene dier (afbeelding 1A), en weinig tot geen schade in het beeld van het andere (afbeelding 1B), dat blijkbaar door experi-



De nieuwe geïntegreerde PET/CT scanner.

mentele vaccinatie is beschermd. Met PET/CT kan de ontwikkeling van weefselschade en ontsteking in de tijd worden gevolgd. En zelfs bij lagere infectiedoses kan PET/CT minimale ziekte, en dus de eventueel beschermende werking van een nieuwe behandelmethode registreren. PET/CT is een waardevolle techniek om een

krachtigere uitspraak over de werking van nieuwe behandelmethode te kunnen doen en om het ongerief voor de dieren te beperken (Verfijning).

In de toekomst hoopt het BPRC geavanceerde beeldvorming ook in andere onderzoekslijnen in te kunnen zetten.

Vergelijkende Genetica en Verfijning

De genetische kenmerken van de apen in het BPRC worden onderzocht door medewerkers van de afdeling Vergelijkende Genetica en Verfijning. Voor het genetisch onderzoek wordt tijdens de jaarlijkse gezondheidscontrole van elk dier in de kolonie een bloedmonster afgenomen, waaruit dan het erfelijk materiaal (DNA) wordt geïsoleerd. DNA-moleculen zijn lange ketens, die worden gevormd door vier verschillende chemische bouwstenen, of nucleotiden. Een gen is een deel van het DNA dat binnen de cel wordt vertaald naar een eiwit. In feite besturen eiwitten alle chemische processen binnen de cel en bepalen daarmee alle kenmerken van een organisme. De nucleotide volgorde van een gen kan per individu verschillen en is erfelijk. Het onderzoek van de afdeling bestaat voornamelijk uit het bepalen van de nucleotide volgorde van MHC genen, die een belangrijke rol spelen in de immunologische afweer tegen ziekteverwekkers. Sommige varianten van deze MHC genen zijn geassocieerd met gevoeligheid voor bepaalde infectieziekten, terwijl andere juist tot resistentie kunnen leiden. De informatie over de MHC genen kan gebruikt worden om dieren te selecteren voor biomedisch onderzoek en zijn derhalve een vorm van verfijning. Voorts worden de genetische typering gebruikt voor ouderschapsbepalingen en het voorkomen van inteelt in onze fokkolonies.

De afdeling verricht ook genetisch onderzoek voor andere instituten en dierentuinen. Er wordt onderzoek gedaan aan DNA dat wordt verkregen uit haarmonsters en ontlasting van dieren die met uitsterven worden bedreigd. Dit kan antwoord geven op vragen over ouderschap, inteelt en het teruglopen van genetische variatie van bepaalde genen. Dit laatste is belangrijk omdat dit een aanwijzing kan zijn voor de toename van bepaalde ziektes binnen een primatenpopulatie. De kwaliteit van dergelijk DNA, en de hoeveelheid informatie die eruit wordt verkregen, zijn echter beperkt. Het BPRC heeft nog de beschikking over celmateriaal en DNA van de voormalige chimpansee-kolonie. Hoewel deze dieren reeds zijn ondergebracht in diverse Europese dierentuinen en opvangcentra, wordt er met behulp van dit celmateriaal en DNA nog steeds onderzoek verricht. In vergelijkend onderzoek met de mens hoopt men antwoorden te krijgen op vragen over virus infecties die zowel de mens als chimpansees treffen. Voorbeelden hiervan zijn HIV en HCV (hepatitis C virus). Op niet-invasieve wijze wordt kennis verkregen over ziekten, en kan het BPRC tevens een bijdrage leveren aan het behoud van met uitsterven bedreigde aapsoorten (conservatiebiologie).



DNA staat voor Deoxyribonucleic acid. In het Nederlands: Desoxyribonucleïnezuur.



MHC staat voor Major Histocompatibility Complex.

Alternatieven

Binnen de Unit Alternatieven wordt wetenschappelijk onderzoek verricht met als doel het vervangen, verminderen of verfijnen (de drie V's) van dierexperimenteel onderzoek. Het onderzoek binnen de Unit Alternatieven is georganiseerd langs twee hoofdlijnen die in de volgende alinea's worden omschreven. Daarnaast fungeert de Unit Alternatieven als centrale communicatiebron voor de onderwerpen die te maken hebben met alternatieven voor dierproeven binnen het BPRC. Tevens wordt er actief bijgedragen aan het publieke debat over dierproeven en de alternatieven daarvoor. Dit gebeurt mede middels publicatie van dit proefdierkundig jaarverslag.

De eerste onderzoekslijn binnen de unit is gericht op verfijning van dierexperimenteel onderzoek binnen het instituut. Om het immuunsysteem extra te activeren wordt er bij mensen en proefdieren vaak gebruik gemaakt van hulpstoffen (*adjuvantia*). Helaas gaat het injecteren van adjuvantia vaak gepaard met ongewenste bijwerkingen zoals ontstekingen van de huid op de injectieplaatsen. Binnen de unit wordt op verschillende manieren gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe adjuvantia met vergelijkbare immuunstimulerende werking maar met minder of geen bijwerkingen.

Om de gewenste immuun-stimulerende effecten van adjuvantia te bestuderen hebben we *in vitro* biologische testsystemen ontwikkeld op basis van menselijke cellijnen. Om de ongewenste bijwerkingen van adjuvantia te



bestuderen hebben wij in de afgelopen jaren een *in vitro* kweekmodel opgezet waarvoor menselijk bloed gebruikt wordt. Beide technieken zijn volledig proefdiervrij en hebben er toe geleid dat we zelf een nieuw adjuvant samen hebben kunnen stellen ("MiMyc") dat een zeer krachtig immuun-stimulerend effect zou moeten geven, zonder de bijwerkingen te geven die we bij andere adjuvantia zien.

In 2016 hebben we een *in vivo* experiment uitgevoerd waarbij we de immuun-stimulerende activiteit van MiMyc bestudeerd hebben. Wij hebben daarvoor bij 12 resusapen op verschillende plekken op de rug kleine hoeveelheden adjuvantia in de huid geïnjecteerd. Vervolgens hebben we in de tijd gevolgd of er zich ontstekingsreacties voordeden en deze in kaart gebracht. Verder hebben we wekelijks via het bloed van de dieren bepaald in hoeverre het immuunsysteem geactiveerd was. De dieren zijn verder niet ziek geworden. De resultaten laten zien dat injectie met MiMyc ook *in vivo* immuun-stimulerende activiteit heeft. Ondanks herhaald gebruik en het toevoegen van een antigeen aan MiMyc, bleven de dieren compleet bijwerkingsvrij. Ondanks dat deze resultaten zeer hoopvol stemmen, is hiermee nog niet bevestigd dat MiMyc het huidige adjuvant kan vervangen. Komend jaar willen we een nieuw *in vivo* experiment uitvoeren om te vergelijken of MiMyc daar ook, net als in het laboratorium, een vergelijkbaar vermogen heeft om het immuunsysteem te activeren als het normaal gebruikte adjuvant. Pas wanneer we dat vast hebben kunnen stellen, kunnen we eventueel overgaan tot vervanging van het huidige adjuvant.

Een tweede onderzoekslijn is gericht op het ontwikkelen van nieuwe *in vitro* methoden. Door bijvoorbeeld kweekmethoden op te zetten voor verschillende celtypen (door primaire celkweek of stamceltechnologie) kunnen kandidaat teststoffen of strategieën op deze celkweken getest worden op werkzaamheid, voordat ze eventueel in een proefdier getest zouden worden. Binnen het Instituut wordt dit de *pre in vivo* testfase genoemd. Er zijn hiermee al verschillende kandidaat stoffen uitgeselecteerd waardoor er minder dierproeven nodig waren.

Onze celkweken worden meestal opgezet vanuit bloed of stukjes dierlijk of menselijk materiaal, verkregen uit biopten of van overleden donoren. Belangrijk daarbij is dat er nooit dieren specifiek geofferd worden voor de start van deze kweken, maar dat er altijd sprake is van dieren die vanwege ouderdom of beëindiging van een ander experiment geëuthanaseerd zijn. In tegenstelling tot het werk met cellijnen zijn deze kweeksystemen vaak kortdurend en eindig. Toch hebben deze primaire celkweken vaak een betere

voorspellende waarde dan cellijnen en is het dus de tijd en moeite waard om deze bij herhaling op te zetten. Het belangrijkste voordeel van cellijnen, hun onsterfelijkheid, is namelijk tevens hun belangrijkste nadeel. Onsterfelijke cellijnen verliezen na verloop van tijd hun cel-specifieke eigenschappen en lijken dan nog het meest op tumorcellen waardoor het testen van bepaalde ideeën of behandelingsmethoden niet goed meer mogelijk is. Ultiem doel is om de diermodellen uiteindelijk geheel te kunnen vervangen door *in vitro* methoden.

Wij hebben de afgelopen jaren technologieën ontwikkeld die het mogelijk maken om met name cellen op te kweken uit het centraal zenuwstelsel (astrocyten en microglia) alsmede cellen die een belangrijke rol spelen in het immuunsysteem (macrofagen en dendritische cellen uit bloed en beenmerg). Eén van de belangrijke voordelen van deze technieken is dat op deze manier cellen van verschillende oorsprong, maar wel uit dezelfde donor, met elkaar vergeleken kunnen worden. In 2016 is Saskia Burm op dit onderzoek gepromoveerd.



Lees meer over Saskia's onderzoek op onze website.



Lees meer op Wiley Online Library.



Lees meer in Journal of Neuroinflammation.

Haar onderzoek laat zien dat microglia (afweercellen in het brein) zich lijken te hebben aangepast aan hun kwetsbare leefomgeving. Ze reageren minder destructief op gevaar dan hun soortgenoten in andere organen. Verder heeft zij laten zien dat een specifieke signaalstof van het immuunsysteem, IL-1 β , mogelijk een rol speelt bij de ontwikkeling van laesies in de hersenen van mensen met multiple sclerose (MS). IL-1 β lijkt met name te worden gemaakt in een heel vroeg stadium van een zich ontwikkelende laesie, en dan met name door lokaal aanwezige microglia.

Al het beschreven onderzoek is uitgevoerd in patiëntmateriaal en met behulp van celkweek methoden die op het BPRC ontwikkeld zijn. Dit type onderzoek draagt hiermee niet alleen bij aan een beter begrip in de rol van microglia in de ontwikkeling van MS laesies, maar ook aan de ontwikkeling en het gebruik van methoden waarvoor geen levende proefdieren nodig zijn. Daarnaast opent het nieuwe onderzoeksrichtingen voor het specifiek blokkeren van bepaalde celtypen om zo het ziektebeloop van MS te beïnvloeden.

Openheid en communicatie

Naast het inpassen van de drie V principes binnen de eigen organisatie participeert het BPRC ook in verschillende (inter)nationale gremia die zich bezighouden met proefdiergebruik. Onze dierverzorgers, diertrainers, dierenartsen en ethologen nemen actief deel aan verschillende (inter-) nationale meetings en congressen waarbij ervaringen met vakgenoten uitgewisseld worden. Ook zijn ze actief betrokken bij organisaties zoals de Biotechnische Vereniging, de Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde, en de Europese Vereniging voor Dierenartsen. Door het uitwisselen van ervaringen met vakgenoten kunnen methoden en protocollen van verschillende instituten op het gebied van voeding, huisvesting en verzorging gestandaardiseerd worden en wordt een belangrijke bijdrage geleverd aan de drie V's en dus aan het dierenwelzijn.

Door het geven van rondleidingen, open dagen en voorlichtingen probeert het BPRC zo transparant mogelijk te zijn. Vanzelfsprekend kan dit alleen met inachtneming van het waarborgen van de veiligheid en gezondheid van dier en mens. Het BPRC biedt studenten de mogelijkheid om hun (afstudeer)stage op het BPRC uit te voeren. Studenten van VMBO, MBO, HBO en Universiteiten maken hier veelvuldig gebruik van. Verder worden er regelmatig rondleidingen verzorgd aan geïnteresseerden, zoals scholieren en studenten, uit binnen- en buitenland.

Daarnaast hebben onze diertrainers en koloniemanager lezingen verzorgd bij verschillende gelegenheden en geeft het BPRC workshops op vaktechnische gebieden. Verder verschaft het BPRC op verzoek informatie aan de Stichting Informatie Dierproeven en levert het sprekers voor debatten over proefdiergebruik. Het hoofd van de unit Alternatieven is sinds 2010 lid van de redactieraad die de brochure "Dierproeven: Zo doen ze dat!" op inhoud toetst.

Internationaal heeft het BPRC een actieve rol in de initiatieven die georganiseerd worden door het Engelse Centrum voor de 3Vs (UK National Centre for 3Rs) om het gebruik van alternatieven te stimuleren (Expert working group 'Non-human primates in monoclonal antibody studies').



Bezoek de website van Stichting Informatie Dierproeven.



Bezoek de website van UK National Centre for 3Rs.



BPRC Proefdierkundig Jaarverslag 2016

