

Proefdierkundig Jaarverslag 2011



INHOUDSOPGAVE

Inleiding	3
Onderzoeksonderwerpen binnen het BPRC	4
Traject voorafgaand aan een dierproef	4
Dierexperimenten Commissie	5
 Dierexperimenteel onderzoek	
Aantal DEC aanvragen	6
Details dierexperimenteel onderzoek	7
 Alternatieven	
Huisvesting	8
Veterinaire zorg, welzijn en verrijking	8
Unit Alternatieven	9
Alternatieven binnen de andere wetenschappelijke afdelingen	11
<i>Uitgelicht: De ontwikkeling van een in vitro systeem voor onderzoek aan de slapende leverstadia van malaria</i>	14
Deelname gremia	16

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 verdieping van de kennis over het ontstaan en het beloop van chronische- en infectieziektes. Het doel van het toegepast onderzoek is 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 en zij gaan dan ook vergezeld met maatschappelijke zorg over het welzijn van de proefdieren. Naast de afdelingsbrede incorporatie van de **3V** principes (**V**ervanging, **V**ermindering en **V**erfijning) in zowel het verkennend als het toegepast onderzoek, wordt er binnen het BPRC in een aparte Unit aan de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven gewerkt.

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, de rol van de dierexperimenten commissie, de aantallen dieren die ingezet zijn in 2011, alsmede over de ontwikkelingen op het gebied van alternatieven voor dierproeven.



Onderzoeksonderwerpen binnen het BPRC

De gezondheid van mensen in de ontwikkelde delen van de wereld is de afgelopen 100 jaar aanzienlijk verbeterd. Mensen leven langer en vaak in betere gezondheid. Deze verbeteringen zijn deels het gevolg van de geneesmiddelen en vaccins die in deze periode, vaak mede dankzij proefdier onderzoek, zijn ontwikkeld. Om ziektes die nog niet voorkomen of genezen kunnen worden succesvol te bestrijden is uitbreiding van onze kennis noodzakelijk. Biomedisch onderzoek vormt dan ook 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, recreatieve drugs of wapens. Momenteel wordt er bij het BPRC onderzoek verricht met als doel om ziektes zoals AIDS, griep, malaria, tuberculose, multiple sclerose, de ziekte van Parkinson en reumatoïde artritis te bestrijden. Tevens wordt er gewerkt aan medische vraagstukken zoals transplantaatafstoting. De Nederlandse wet bepaalt dat hiervoor alleen apen ingezet mogen worden als er geen geschikte alternatieven zijn. Naast onderzoek waarbij proefdieren ingezet worden, wordt er in dit kenniscentrum 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 **3V's** die staan voor **V**ervanging, **V**ermindering en **V**erfijning. Onderzoek naar het ontwikkelen van alternatieven is ondergebracht in een unieke, onafhankelijke Unit. Daarnaast wordt in alle andere onderzoeksafdelingen het gebruik en het ontwikkelen van alternatieven actief ondersteund en gestimuleerd.

Traject voorafgaand aan een dierproef

Voordat een dierproef uitgevoerd kan worden, is er al een lange weg afgelegd. De eerste selectie van mogelijke kandidaat-geneesmiddelen vindt altijd plaats in het laboratorium door middel van *in vitro* technologie. Hierbij worden geen proefdieren gebruikt. Hoe beter deze technologie de *in vivo* situatie in een mens of dier benadert, des te beter de voorspellende waarde voor de eventuele werking in de mens. Na een *in vitro* testfase kunnen mogelijk interessante ideeën of moleculen in aanmerking komen voor *in vivo* testen. Zulke ideeën of moleculen 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 dierexperimenten commissie is afgegeven.

Dierexperimenten Commissie

De Wet op de Dierproeven schrijft voor dat een experiment waarbij proefdieren ingezet worden pas mag worden uitgevoerd wanneer de dierexperimenten commissie (DEC) hierover een positief advies heeft uitgebracht aan de vergunninghouder van de instelling waar de proef wordt uitgevoerd. De DEC bestaat uit deskundigen op het gebied van dierproeven, alternatieven voor dierproeven, dierenbescherming en -welzijn en toegepaste (bio-)ethiek alsmede uit niet-deskundigen die uit verschillende geledingen van de samenleving afkomstig zijn. De voorzitter van de DEC is géén BPRC werknemer. De proefdierdeskundige die krachtens artikel 14 van de wet is aangesteld bij het BPRC, is permanent adviseur van de DEC en neemt zonder stemrecht aan de DEC vergaderingen deel. Om de onafhankelijkheid van deze positie te waarborgen heeft het BPRC er voor gekozen om voor deze positie een externe kandidaat aan te stellen.

De DEC heeft de lastige taak om het te verwachten ongerief van het proefdier af te wegen tegen het wetenschappelijk belang van het experiment. Elk afzonderlijk experiment wordt in een plenaire vergadering met alle DEC leden uitgebreid besproken. Vaak heeft de commissie aanvullende informatie nodig voordat ze tot een beslissing kan komen.

Een belangrijk onderdeel van de ethische afweging die de DEC maakt is de taak om het voorstel om proefdieren in te zetten nauwgezet te toetsen op de mogelijkheid alternatieve methoden te gebruiken. 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 zouden kunnen worden dan zal de DEC negatief adviseren en wordt de voorgenomen dierproef niet uitgevoerd.



Aantal DEC aanvragen

In 2011 zijn er aan de DEC van het BPRC in totaal 27 nieuwe aanvragen ter advies voorgelegd. Over 11 nieuwe aanvragen werd direct positief geadviseerd. Bij 8 aanvragen werd een intentie tot positief advies uitgebracht, maar moest de onderzoeker aanvullende vragen beantwoorden en aan voorwaarden voldoen. De overige 8 aanvragen werden in eerste instantie niet van advies voorzien. Er moest eerst additionele informatie worden gegeven voordat een advies kon worden uitgebracht. Uiteindelijk kregen 24 van de nieuwe aanvragen een positief advies. Bij 3 aanvragen is geen advies gegeven na terugtrekking van de aanvraag door de onderzoeker.

De overige aanvragen betroffen aanpassingen op al lopende experimenten. Omdat er tijdens experimenten omstandigheden kunnen veranderen, is het soms noodzakelijk om de onderzoeksplannen tijdens de uitvoering van het experiment aan te passen. Het betreft veelal kleine wijzigingen die geen extra ongerief met zich meebrengen of soms zelfs gericht zijn op het verminderen van het ongerief. Het kan ook zijn dat de onderzoeker dient te anticiperen op de uitkomsten van een onderzoek. Toch dienen ook zulke aanpassingen door de DEC beoordeeld te worden. In totaal werd er in 2011 43 keer een positief advies uitgebracht over aanpassingen.

Het ontbreken van negatieve adviezen kan hoogstwaarschijnlijk worden toegeschreven aan een uniek voortraject waarin niet goed onderbouwde onderzoeksvoorstellen worden uitgefilterd. Onderzoekers dienen voorgenomen experimenten aan de hand van een uitgebreid formulier zeer nauwkeurig te beschrijven, alsmede de mogelijkheden en onmogelijkheden tot het gebruik van alternatieven te verkennen en te onderbouwen. Deze experimenten zijn daarvoor vaak al op wetenschappelijke kwaliteit beoordeeld en gevalideerd door collega's in het onderzoeksveld. Vervolgens wordt de aanvraag door de proefdierdeskundige en door een door het BPRC ingestelde interne leescommissie op volledigheid nagekeken voordat het uiteindelijk voor advies wordt ingediend bij de DEC. De kans dat hier dan nog slecht doordachte of ethisch niet goed afgewogen voorstellen tussen zitten is daarmee buitengewoon gering geworden.

Details dierexperimenteel onderzoek

In totaal werden er in 2011 25 studies bij het BPRC verricht waarbij in totaal 184 proefdieren ingezet zijn. Meer specifiek zijn er 143 resusmakaken ingezet in 17 studies, 12 Javamakaken in 1 studie en 29 marmosetapen (ook bekend als witoorpenseelaapjes) in 7 studies.

Bij het BPRC worden experimenten verricht die de volgende doelen dienen: onderzoek m.b.t. de mens (pre-klinisch onderzoek zoals de ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen) en 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 gebruikt.

Doelen	Resusmakaken	Javamakaken	Marmosets
Onderzoek m.b.t. de mens	115	12	18
Wetenschappelijke vraag	28	0	11

Tabel 1. Aantallen ingezette dieren per doel.

Een belangrijke factor voor het advies dat een DEC geeft, is het te verwachten ongerief voor de ingezette proefdieren (zie: Dierexperimenten Commissie). Daarnaast houdt 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 zwaarder moeten de wetenschappelijke en volksgezondheid belangen zijn om het experiment te mogen uitvoeren. Ondanks dat ongerief moeilijk is te kwantificeren blijken de volgende categorieën in de praktijk goed bruikbaar:

1, gering ongerief (zoals een enkele bloedafname, maar ook onnatuurlijke huisvesting); 2, gering tot matig ongerief; 3, matig ongerief (zoals frequente bloedafnames en vaccinatie); 4, matig tot ernstig ongerief; 5, ernstig ongerief (zoals ziekte verschijnselen van AIDS, tuberculosis, artritis); 6, zeer ernstig ongerief. Onderzoek waarbij zeer ernstig ongerief *vooraf* wordt ingeschat wordt niet geaccepteerd binnen het BPRC.

In tabel 2 is per diersoort het ontvangen ongerief gespecificeerd.

Ontvangen ongerief	Resusmakaken	Javamakaken	Marmosets
Gering	1	0	1
Gering/matig	17	0	6
Matig	88	12	4
Matig/ernstig	34	0	4
Ernstig	3	0	14
Zeer ernstig	0	0	0

Tabel 2. Ingeschat ongerief ondergaan door ingezette dieren.

ALTERNATIEVEN

Huisvesting

Een van de belangrijke doelstellingen van het BPRC is het sociaal huisvesten van alle dieren. In 2011 is ook de nieuwe conventionele huisvesting in gebruik genomen, waarna direct de verouderde huisvesting gesloopt is. Alle dieren beschikken nu over huisvesting die volledig voldoet aan de nieuwe Europese Richtlijn 63/2010. Deze nieuwe huisvesting samen met het uitgebreide programma voor training en verrijking dragen bij aan een verdere verbetering van het dierenwelzijn.

In 2011 zijn in de fokkolonie van het BPRC 148 geboortes geweest bij de resusmakaken, 18 bij de Javamakaken en 74 bij de marmosets.

Veterinaire Zorg, welzijn en verrijking

De drie dierenartsen van het BPRC houden zich naast hun taken met betrekking tot de veterinaire zorg voor alle dieren ook bezig met het verbeteren en vernieuwen van technieken. Aandachtspunten hierbij zijn het dieet van de dieren, toepassen van nieuwe medicatie en het toepassen van niet-invasieve of minder invasieve technieken. In 2011 heeft het BPRC samen met EUPRIM en de European Primate Veterinarians een workshop gehouden gericht op niet-invasieve en nieuwe technieken. Deze workshop werd door een groot aantal wetenschappers en dierenartsen van instituten uit heel Europa bezocht.

Het “Verrijkinghandboek voor makaken en marmosets”, dat door het BPRC in samenwerking met EUPRIM-NETII is gemaakt is een groot succes. Inmiddels zijn op aanvraag al meer dan 200 exemplaren aan een groot aantal instanties binnen Europa verstuurd. In 2011 hebben de diertrainer en de kolonimanager van het BPRC verschillende bijeenkomsten bijgewoond en/of georganiseerd van Europese experts in diertraining en welzijn van apen. Deze samenwerking heeft als doel het verder verbeteren van welzijn van primaten in onderzoeksinstituten en het BPRC heeft hierbij een leidende rol. Onderzoeksactiviteiten gericht op welzijnsverbetering en de controle hiervan richten zich onder meer op het verbeteren van diagnostiek en opzetten van methodes om stresshormonen te bepalen met behulp van niet-invasieve technieken. Naast de betrokken onderzoekers werken hier vaak studenten van verschillende hogescholen en universiteiten mee.

Vanzelfsprekend blijft veel aandacht besteed worden aan veterinaire aspecten, gezondheidscontrole's van de kolonie en aan het opleiden van medewerkers tot betere diertrainers. Openheid over het gebruik van niet-humane primaten bij het BPRC wordt verzorgd via de jaarverslagen en rondleidingen waarbij we inzage geven in het houden van de dieren en in het onderzoek van het instituut.

Unit Alternatieven

Binnen de **Unit Alternatieven** wordt wetenschappelijk onderzoek verricht met als doel het vervangen, verminderen of verfijnen van dierexperimenteel onderzoek. Daarnaast fungeert de Unit Alternatieven als centrale communicatiebron voor de onderwerpen die te maken hebben met alternatieven voor dierproeven binnen het BPRC en wordt actief bijgedragen aan het publieke debat over dierproeven en de alternatieven daarvoor. Dit gebeurt mede middels publicatie van dit proefdierkundig jaarverslag.

Het wetenschappelijk onderzoek binnen de Unit Alternatieven is georganiseerd langs twee hoofdlijnen. Voor beide hoofdlijnen is in 2010 steun verworven van de Europese Unie, waarvoor de Unit binnen het kader van EUPRIM-NETII het onderzoek naar alternatieven voor primaten coördineert.

De eerste onderzoekslijn is gericht op het ontwikkelen van *in vitro* methodiek (proeven in het lab in plaats van proeven in een dier) die ingezet kan worden om experimenten met levende dieren te vervangen of te verminderen. Veel teststoffen hebben effecten op bepaalde celtypen. Door kweekmethoden op te zetten voor deze specifieke celtypen (middels primaire celkweek of stamcel technologie) kunnen kandidaat teststoffen in een *pre in vivo* fase op deze celkweken getest worden. Primaire celkweken worden opgezet vanuit bloed of stukjes dierlijk of menselijk materiaal zoals verkregen uit biopten of van donoren. Belangrijke notie daarbij is dat er nooit dieren specifiek geofferd worden voor de start van deze experimenten, maar dat er altijd sprake is van dieren die vanwege ouderdom of beëindiging van een ander experiment geëuthanaseerd worden. In tegenstelling tot het werk met cellijnen zijn deze kweeksystemen vaak kortdurend en eindig. Toch hebben 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.

In 2011 is uitgebreid gebruik gemaakt van in voorgaande jaren ontwikkelde technologieën waarbij met name cellen uit het centraal zenuwstelsel gekweekt zijn (astrocyten en microglia), alsmede cellen die een belangrijke rol spelen in het immuunsysteem (macrofagen en dendritische cellen opgekweekt uit bloed en beenmerg). Studies met deze celtypen hebben geleid tot verschillende nieuwe inzichten (waarover een review paper is gepubliceerd) en werden ook dit jaar vaak ingezet als *pre in vivo* testfase. Het opzetten van complexere *in vitro* systemen zoals co-culturen en zeer dunne plakjes hersenweefsel is in 2011 door ontwikkeld, maar problemen met visualisatie technieken zijn nog een uitdaging. Ultiem doel is om de diermodellen uiteindelijk geheel te kunnen vervangen door *in vitro* methoden.

Een tweede onderzoekslijn is gericht op verfijning van de immunisatie protocollen binnen het instituut. Om het immuunsysteem extra te activeren wordt er bij mensen en proefdieren vaak gebruik gemaakt van adjuvantia. Eén van de krachtigste adjuvantia die bij proefdieren gebruikt wordt is compleet Freund's adjuvant (CFA). Helaas gaat het gebruik van dit adjuvant vaak gepaard met ongewenste bijwerkingen zoals ontstekingen van de injectieplaatsen. Binnen de Unit wordt op verschillende manieren gewerkt aan de vervanging van CFA door een adjuvant met vergelijkbare werking maar met minder of geen bijwerkingen.

Om de ongewenste bijwerkingen te modelleren hebben wij in de afgelopen jaren een *in vitro* granuloma model opgezet, waarvoor menselijk bloed gebruikt wordt en maken wij gebruik van zelf ontwikkelde bioassays om de gewenste immuunstimulatorische werking van een adjuvant te kunnen testen. In 2011 hebben wij een begin gemaakt met het opzetten van een 3D-*in vitro* granuloma model om zo nog nauwkeuriger en natuurgetrouwer de bijwerkingen in een kweekschaaltje na te kunnen bootsen. Wij hebben verschillende benaderingen, kweekmedia en kweekmatrices getest en zijn er in geslaagd om een combinatie te vinden die goed werkt. In 2012 zullen we verder werken aan het automatiseren en kwantificeren van dit model systeem.

Alle beschreven technieken zijn volledig proefdiervrij en worden nu gebruikt in top-down en bottom-up benaderingen. Bij de top-down benadering nemen we het oorspronkelijke CFA als uitgangspunt en proberen we in de bacteriestam die daar in aanwezig is, middels mutatietechnologie, kleine veranderingen aan te brengen om zodoende de onwenselijke bijverschijnselen te verminderen. Bij de bottom-up benadering is het oorspronkelijke CFA in zeer kleine onderdelen opgesplitst en worden deze onderdelen allen eerst afzonderlijk in bioassays getest op de gewenste immuunstimulatorische activiteit. Onderdelen die immuno-actief actief zijn zouden dan in de toekomst als basisbouwstenen voor een nieuw adjuvant gebruikt kunnen worden. In 2011 hebben we met name vooruitgang geboekt in de top-down benadering. Verschillende gemuteerde bacteriestammen zijn geselecteerd die *in vitro* veel minder granulomas veroorzaken dan de oorspronkelijk in CFA aanwezige stam. Deze stammen zijn in een *in vivo* pilotexperiment getest als vervangingsalternatief voor CFA en van een drietal stammen hebben wij bevestigd gekregen dat deze inderdaad minder bijwerkingen geven. Deze stammen zullen de komende jaren uitvoerig verder getest worden. Aangezien CFA behalve in apen ook in veel andere proefdieren gebruikt wordt, heeft een eventueel succes om CFA bijwerkingsvrij te krijgen waarschijnlijk ook implicaties voor vele andere proefdieren.

Alternatieven binnen de andere wetenschappelijke afdelingen

De 3V's binnen het BPRC hebben niet exclusief onderdak bij de Unit Alternatieven. Ook binnen de andere onderzoeksafdelingen wordt er hard aan de toepassing van Alternatieven voor Dierproeven gewerkt.

Op de afdeling **Vergelijkende Genetica en Verfijning** worden geen experimenten op dieren uitgevoerd. Voor het genetisch onderzoek is van elke aap DNA nodig. Dit wordt verkregen uit een bloedafname tijdens de jaarlijkse gezondheidscontroles van de dieren. Tevens is het mogelijk om uit dit bloedmonster de witte bloedcellen zodanig te bewerken dat deze cellen zich in een kweekfles blijven delen. Op deze wijze is men verzekerd van een bron om opnieuw DNA te isoleren, en hoeft voor dit doel geen bloed meer te worden afgenomen.

De afdeling onderzoekt genen die coderen voor eiwitten van het immuunsysteem. De nadruk ligt hierbij op de genen van het Major Histocompatibility complex (MHC). De eiwitten van dit complex spelen een belangrijke rol in de herkenning van lichaamsvreemde substanties. De genen van het MHC kunnen van dier tot dier sterk variëren, en dit kan leiden tot verschillen in gevoeligheid voor immuun gerelateerde ziekten. De MHC typeringen kunnen worden gebruikt om apen te selecteren voor onderzoek naar ziekten. Deze selectie van gevoelige apen kan het aantal dieren nodig voor een experiment verminderen.

Genen bestaan uit de stof DNA, en dit is weer opgebouwd uit lange ketens van vier chemisch bouwstenen of basen. Het genetisch onderzoek binnen de afdeling bestaat voornamelijk uit het bepalen van de basenvolgorde in de genen, het zogenaamde "sequenzen". In de jaren '90 werd dit handmatig uitgevoerd met een radioactieve Sanger-sequencing reactie, gevolgd door elektroforese. Resultaat waren de welbekende röntgenfoto's met streepjespatronen. De basenvolgorde werd met de hand afgelezen, en opgeschreven in reeksen van vier letters. In 1997 werd deze techniek vervangen door schone en snelle geautomatiseerde systemen. De Sanger-reactie werd nu uitgevoerd met fluorescerende markers, gevolgd door elektroforese en detectie in een machine. De basenvolgorde van de genen kwam hierbij digitaal beschikbaar in vier letter codes.

Sinds 2011 heeft de afdeling voor Vergelijkende Genetica de beschikking over een 454-sequencing machine, die werkt volgens de principes van Next Generation Sequencing. De Sanger-reactie is vervangen door pyrosequencing, een chemische reactie waarbij licht vrijkomt. De sequencing reactie en de detectie vinden tegelijkertijd plaats in het apparaat, en de gedetecteerde lichtsignalen worden vertaald naar volgorden van vier letters. De capaciteit van deze verfijnde machine is enorm, in vergelijking met de oude systemen. Waar met de oude apparaten nog hooguit 200.000 basen per run werd gehaald, loopt de capaciteit nu op tot 35 miljoen basen per run.

Door de aanschaf van deze machine kan de afdeling sneller en beter voldoen aan de vraag van onderzoekers in andere afdelingen. Daarnaast kunnen analyses uitgevoerd worden aan het DNA van apen uit andere onderzoeksinstituten dat kan leiden tot verfijning van primatenonderzoek aldaar. Voorts is het mogelijk het onderzoek uit te breiden naar andere genen die een rol spelen bij immuniteit. Dit kan leiden tot een nog nauwkeuriger selectie van de dieren nodig voor onderzoek.

In de afgelopen proefdierkundige jaarverslagen rapporteerde de afdeling **Immunobiologie** over de ontwikkeling van een nieuw experimenteel model voor multipale sclerose (MS) in penseelaapjes (marmoset, *Callithrix jacchus*) door immunisatie met een 23-meer peptide in incompleet Freund's adjuvant (IFA). De ontwikkeling van dit experimenteel geïnduceerde encephalomyelitis (EAE) model is het resultaat van een jarenlange zoektocht naar het immunologische kernproces waardoor de dieren op MS gelijkende neurologische symptomen ontwikkelen. Het blijkt dat geheugen T lymfocyten, waarschijnlijk degene die zijn aangelegd ter bescherming tegen een herpesinfectie (cytomegalovirus), de belangrijkste aanjagers zijn van de ziekte EAE. Uit verder onderzoek is gebleken dat B lymfocyten, die zijn geïnfecteerd met een ander herpesvirus verwant aan het Epstein Barr Virus (EBV), namelijk *Callithrix herpesvirus 3* (CalHV3) een essentiële rol spelen in de activatie van de pathogene T lymfocyt. Immers, de effectiviteit van therapeutische antistoffen gericht tegen B lymfocyten blijkt samen te hangen met de mate waarin CalHV3 geïnfecteerde B cellen worden gedepleteerd. Dit nieuwe model verschaft derhalve inzicht in de specifieke rol van B lymfocyten in MS. Het onderzoek naar de vervanging van CFA door IFA is uitgebreid naar het EAE model dat wordt geïnduceerd met recombinant humaan MOG eiwit (rhMOG). Het blijkt dat immunisatie met rhMOG in IFA effectief is in de inductie van EAE in marmosets (6 uit 6 responders), maar niet in resusapen (2 uit 6 responders). Het viel op dat de 2 resusapen die klinisch evidente EAE ontwikkelden, beide een goede IgM antistof respons tegen rhMOG hadden.

Een tweede belangrijke ontwikkeling is de verfijning van een model voor de ziekte van Parkinson in marmosets. De ziekte van Parkinson is een chronisch progressieve aandoening van het centraal zenuwstelsel dat zich o.a. kenmerkt door motorische verstoringen. Vanwege het toenemend belang van onderzoek naar neurodegeneratie, in verband met de toenemende incidentie van aan veroudering gerelateerde aandoeningen in de vergrijzende samenleving, is binnen BPRC het MPTP-geïnduceerde model in de marmosetaap voor de ziekte van Parkinson opgezet. Naast het subacute model, is recentelijk gestart met een chronisch inductie model van lage doseringen van de neurotoxische stof MPTP. Door dit nieuwe inductie protocol is het mogelijk om naast de symptoom onderdrukkende therapieën ook naar preventieve middelen, die schade voorkomen of afremmen, onderzoek te doen. Dit is van belang omdat de huidige strategieën nog steeds gericht zijn op alleen het onderdrukken van symptomen maar het degeneratieve proces in de hersenen niet stoppen. Om het effect op de progressie van de ziekte op een niet-invasieve manier in de tijd te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van gedragsopstellingen voor motorisch-gerelateerde functies zoals activiteit, hand-oog coördinatie, reflexen en springgedrag. Voor onderzoek naar de vroege fase van de ziekte is het echter ook noodzakelijk om merkers te hebben voor de pre-motorische fase zoals slaap verstoringen middels electroencephalogram (EEG) metingen. Deze methode is opgezet waarbij in het vrij bewegende dier via telemetrie de hersenactiviteit in de thuiskooi geregistreerd kan worden. Deze gedragstestopstellingen en telemetrische EEG techniek dragen bij aan de verfijning van de meetmethodes binnen onze ziektemodellen.

Een derde belangrijke ontwikkeling is een model voor reumatoïde artritis in marmosets. In tegenstelling tot het acute collageen-geïnduceerde artritis model in resusapen, ontwikkelen marmosets een veel minder heftig en meer chronisch verlopend ziektebeeld. Het marmoset model is in 2 opzichten een verfijning. Vanwege de mindere gevoeligheid van marmosets voor de mycobacteria in het gebruikte compleet Freund's adjuvant, treden er minder ernstige huid lesies op dan in resusapen. Bovendien kunnen door het gebruik van tweelingen, die immunologisch beter vergelijkbaar zijn dan niet verwante apjes (zoals in resusapen), kleinere experimentele groepen worden gebruikt.

In 2011 heeft de afdeling **Virologie** verder geïnvesteerd in het ontwikkelen van *in vitro* testen, om zodoende meer gedetailleerde informatie te verkrijgen omtrent de werking en effectiviteit van nieuwe vaccin preparaten. Een voorbeeld hiervan is het werk aan de lever. De lever is een orgaan waarin verschillende celtypen een belangrijke rol spelen. Welke cellen dit exact zijn en welke rol deze cellen spelen in het ontstaan van leverziekten is niet bekend. Momenteel wordt een methode opgezet om verschillende primaire cellen uit een donorlever van resus apen te isoleren en te karakteriseren. In de toekomst hopen we zo over een *in vitro* kweekstelsel te kunnen beschikken waarin verschillende lever-gerelateerde ziekteprocessen (o.a. veroorzaakt door bijv. een hepatitis C virus infectie) kunnen worden bestudeerd.

Daarnaast blijven we werken aan het verfijnen van bepaalde meettechnieken. Hierdoor kan meer informatie verkregen worden uit biologische materialen verkregen uit de proefdieren. Zo zijn dit jaar meetmethoden ontwikkeld om polyoma, influenza en West Nile virussen te detecteren. Dit vindt plaats vanuit onze diagnostische service unit. Door deze unit is het BPRC in staat geweest om specifieke pathogeen-vrije (SPF) fok kolonies op te zetten en deze virusvrij te houden. Dit betekent dat onze koloniedieren vrij zijn van retrovirussen als SIV, STLV en SRV, en vrij zijn van het herpes B virus. Via deze "Primate Viral Diagnostics unit" wordt ook diagnostische service verleend aan andere instellingen in Europa, zoals dierentuinen, en onderzoekscentra. Daarnaast ondersteunen wij ook apenopvangcentra in Afrika, Azië en Zuid-Amerika.

In 2011 is verder gewerkt met het door de afdeling **Parasitologie** ontwikkelde *in vitro* kweekstelsel van de malaria parasiet *Plasmodium cynomolgi* leverstadia om nieuwe geneesmiddelen te identificeren. Meer details hierover staan elders in dit jaarverslag (zie "**Uitgelicht**"). In een andere onderzoekslijn hebben we genetisch gemodificeerde parasieten gemaakt, waarbij de leverstadia rood en groen fluoresceren. Met behulp van ons *in vitro* kweekstelsel van leverstadia kunnen we nu verschillende leverstadia in redelijk grote hoeveelheden zuiveren om ze dan nader biochemisch te onderzoeken. Dit werk zou zonder dit kweekstelsel niet mogelijk zijn, omdat dan vele apen geïnfecteerd zouden moeten worden en vervolgens geëuthanaseerd om de leverstadia te oogsten.

In 2011 is een begin gemaakt om in samenwerking met andere instituten een *in vitro* kweek te ontwikkelen voor bloedstadia van de humane malaria parasiet *P. vivax*. Mede omdat deze parasiet uitsluitend hele jonge rode bloedcellen (reticulocyten) infecteert is dit tot nu toe niet mogelijk. De eerste stappen in dit onderzoek zijn nieuwe manieren om *in vitro* menselijke reticulocyten te produceren, waarbij in ons lab getest wordt of verschillende malaria soorten deze cellen kunnen infecteren. Dit onderzoek wordt in 2012 voortgezet.

In een eerder stadium hebben wij binnen het tuberculose (TB) onderzoek klinische correlaten geïdentificeerd en gevalideerd die voorspellend zijn voor de ontwikkeling van ernstige progressieve ziekte na experimentele *M.tuberculosis* infectie van de resusaap. Met deze surrogaat markers voor ziekte en overleving in de resusaap is het mogelijk dergelijke tuberculose experimenten - met het oogmerk om verbeterde therapieën voor de mens te ontwikkelen of om een beter inzicht in ziekteontwikkeling dan wel beschermende immuniteit te verkrijgen - korter, met meer statistische power, meer gestandaardiseerd en met minder ongerief voor de dieren uit te voeren. Met gebruik van onze kennis uit het resusmodel zijn we in 2011 een eerste TB infectiestudie gestart in marmosets. Daarbij hebben wij op vergelijkbare wijze klinische correlaten kunnen identificeren die bijdragen tot vermindering en verfijning van het gebruik van deze proefdiersoort voor het onderzoek naar deze, voor de mens nog steeds zeer bedreigende infectieziekte

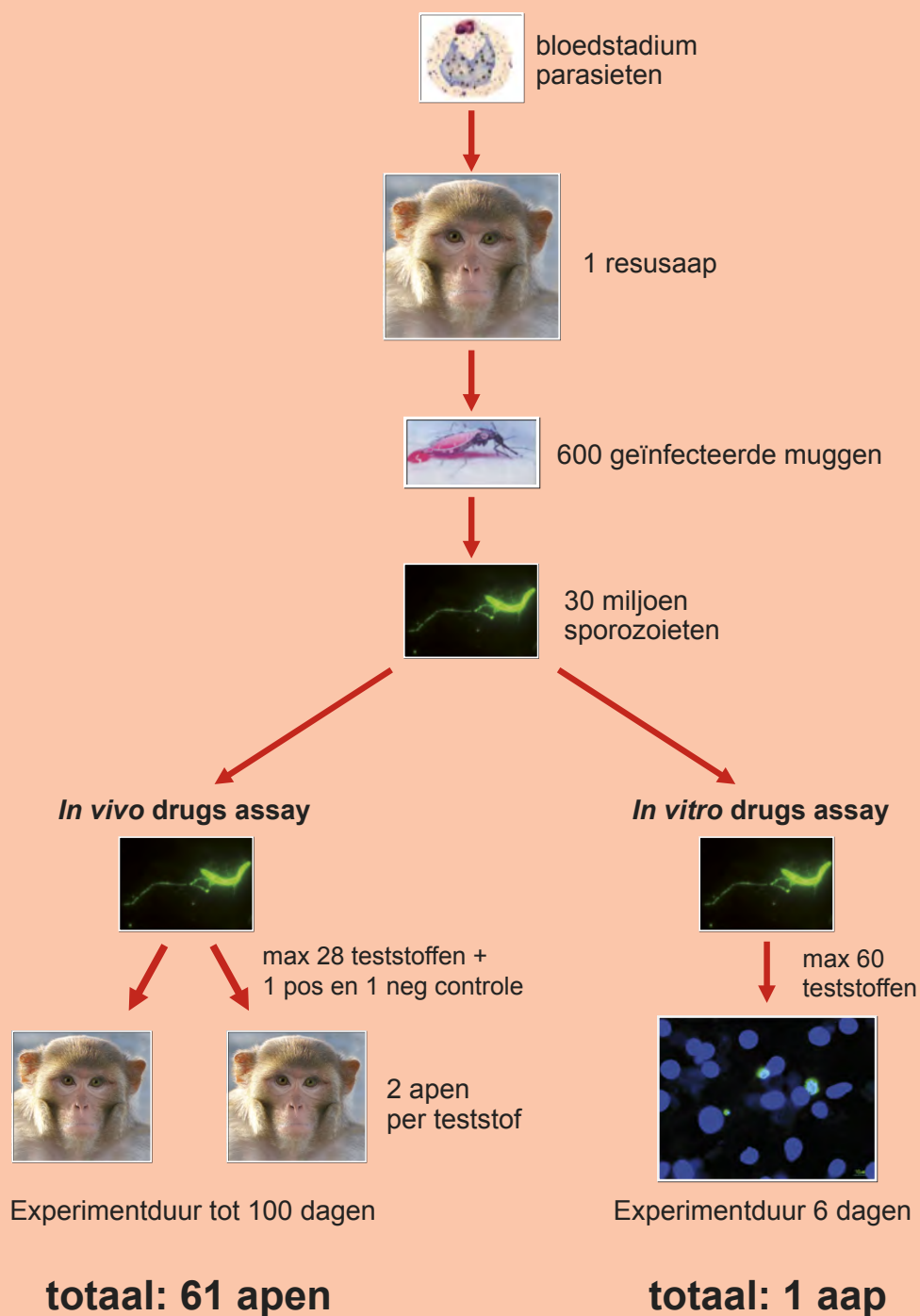
Uitgelicht: De ontwikkeling van een in vitro systeem voor onderzoek aan de slapende leverstadia van malaria.

De malariaparasiet wordt via muggen overgedragen naar de mens. Na de steek door een geïnfecteerde mug gaan de parasieten eerst naar de lever. Later worden rode bloedcellen geïnfecteerd wat de klinische verschijnselen van malaria veroorzaakt. Eén van de voor de mens gevaarlijke malariasoorten heeft als kenmerk dat een gedeelte van de parasieten voor onbepaalde tijd in de lever in een soort winterslaap blijft alvorens zich verder te ontwikkelen tot een ziekteverwekkend stadium. Deze slapende parasieten (hypnozoieten genoemd) worden door onbekende oorzaak gereactiveerd. Om dergelijke malaria parasieten effectief te kunnen bestrijden zijn geneesmiddelen nodig die ook de hypnozoiet doden. Op dit moment is alleen primaquine hiervoor als geneesmiddel geregistreerd. Primaquine veroorzaakt nare bijwerkingen en er is ook al sprake van resistente parasieten, waardoor het middel op niet al te lange termijn niet meer gebruikt zal kunnen worden.

Er is dus dringend behoefte aan nieuwe medicijnen tegen hypnozoieten en daarmee ook aan een testsysteem om mogelijke nieuwe middelen te testen. Hypnozoietvorming is beschreven voor vijf soorten malariaparasieten, die allemaal exclusief primaten (mens of aap) als gastheer hebben. Hierdoor is het onmogelijk om lagere vertebraten zoals muizen te gebruiken als model organisme. Eén van de hypnozoiet-vormende parasieten is *P.cynomolgi*, een malariasoort die resus apen kan infecteren. Als potentiële nieuwe anti-hypnozoiet medicijnen in een *in vivo* model getest zouden moeten worden kan dit dus alleen in apen gebeuren.

Voor een zinvolle proefopzet met doseringsreeksen en de juiste controles zouden vele resusapen nodig zijn. Een dergelijke opzet is naast tijdrovend ook uit ethische overwegingen bezwaarlijk. Er is dus dringend behoefte aan een alternatief. Binnen het BPRC is een *in vitro* systeem opgezet voor het kweken van hypnozoieten, om onder andere te gebruiken voor het testen van nieuwe potentiële anti-hypnozoietmiddelen, wat een aanzienlijke vermindering van het aantal proefdieren op zal leveren. Gebruik makend van reeds bestaande protocollen met andere soorten malariaparasieten (niet-hypnozoiet-vormende malariasoorten) hebben wij een *in vitro* lever infectie systeem voor *P.cynomolgi* opgezet. Hiertoe moet een resusaap besmet worden met *P.cynomolgi* bloedstadium parasieten, want de bloedstadia van de parasiet groeien niet in kweekflesjes. Muggen worden geïnfecteerd met malaria door ze te voeden met geïnfecteerd bloed en ongeveer twee weken later kunnen de parasieten uit de mug worden gehaald. Levercellen worden geïsoleerd uit levers van dieren die om redenen, niet gerelateerd aan dit werk, geëuthanaseerd zijn. Voor dit protocol worden dus nooit specifiek dieren opgeofferd. Door parasieten uit muggen te isoleren en aan de levercellen toe te voegen wordt de leverinfectie nagebootst. In de *in vitro* kweken zijn grote leverstadium parasieten te zien, evenals kleine vormen, die er precies zo uitzien als beschreven is voor hypnozoieten. De hypnozoiet-vormen die we in de kweek zien zijn gevoelig voor primaquine, maar niet voor andere anti-malaria middelen, die wel de ontwikkelende leverstadiumparasieten aanpakken. Dit is overeenkomstig met wat gezien wordt bij hypnozoieten in patiënten. Reactivatie van de kleine leverstadiumparasieten zou het ultieme bewijs zijn dat er inderdaad hypnozoieten in de kweek zitten, maar dat is tot nu toe nog niet aangetoond. Met deze *in vitro* parasietkweek is het mogelijk nieuwe geneesmiddelen tegen slapende leverstadiumparasieten te testen.

Voordat deze test beschikbaar was kon dit alleen in een levend proefdier dat langdurig in experiment moest blijven en veel dierhandelingen zou moeten ondergaan. In Figuur 1 is een voorbeeldschema te zien dat de *in vivo* test vergelijkt met de *in vitro* test. Door het gebruik van de *in vitro* test wordt het aantal proefdieren met 95% verminderd. Met behulp van de nieuwe *in vitro* test hebben we inmiddels zo'n 300 potentiële nieuwe anti hypnozoïet middelen getest, waarvan er een aantal actief zijn.



ALTERNATIEVEN

Deelname gremia

Naast het inpassen van de **3V's** binnen de eigen organisatie participeert het BPRC ook in verschillende (inter)nationale gremia die zich bezighouden met proefdiergebruik. BPRC diervverzorgers, dierenartsen en ethologen nemen actief deel aan verschillende (inter)nationale meetings en congressen waarbij ervaringen met vakgenoten uitgewisseld worden en zijn actief betrokken bij organisaties zoals de Biotechnische Vereniging, de Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde, en Europese Vereniging voor dierenartsen (European Primate Veterinarians). 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 **3V's**.

Verder heeft de secretaris van de DEC van het BPRC zitting in het bestuur van de overkoepelende organisatie van DEC's in Nederland: de NV-DEC. Deze organisatie zet zich vooral in voor scholing en bijscholing van DEC leden.

Het BPRC biedt studenten de mogelijkheid om hun (afstudeer)stage op het BPRC uit te voeren. Studenten van VMBO, MBO, HBO en Universiteiten maken hiervan veelvuldig gebruik. Verder worden er regelmatig rondleidingen verzorgd aan geïnteresseerden, zoals scholieren en studenten. Het afgelopen jaar hebben ongeveer 500 mensen van deze mogelijkheid gebruik gemaakt. Daarnaast verschaft het BPRC op verzoek informatie aan de Stichting Informatie Dierproeven (www.stichtinginformatiedierproeven.nl), levert het sprekers voor debatten over proefdiergebruik, en is het afdelingshoofd van de Unit Alternatieven 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 UK National Centre for 3Rs (NC3Rs: www.nc3rs.org.uk) om het gebruik van alternatieven te stimuleren (Expert working group 'Non-human primates in monoclonal antibody studies').

