

Willy van Heumenprijs voor 'digitaal proefdier'



Dr. ir. Jochem Louisse

Assistant professor Division of Toxicology, Wageningen University, jochem.louisse@wur.nl

De Willy van Heumenprijs is een prijs die eens in de twee jaar wordt uitgereikt door het Willy van Heumenfonds aan 'een persoon of organisatie die zich bijzonder verdienstelijk heeft gemaakt voor het bevorderen dat het gebruik van proefdieren voor medische doeleinden wordt beperkt tot de werkelijk noodzakelijke proefnemingen en dat alternatieven voor het gebruik van proefdieren zo goed mogelijk worden benut' (1).

In oktober 2015 is deze prijs uitgereikt aan Jochem Louisse van de leerstoelgroep Toxicologie van de Wageningen Universiteit. Hij heeft deze prijs ontvangen voor de ontwikkeling van gecombineerde *in vitro* (op cellen gebaseerde) modellen en computermodellen (een 'digitaal proefdier') als alternatief voor dierproeven die gebruikt worden in de toxicologische risicobeoordeling.

In de toxicologische risicobeoordeling van stoffen worden vaak dierproeven (*in vivo* studies) ingezet. Dit is vastgelegd in wet- en regelgeving. Met zulke dierproeven wordt bepaald welke dosis van een stof een toxisch effect veroorzaakt. Aan de hand van deze data wordt een schatting gemaakt wat een veilige (niet-toxische) blootstelling in de mens zou zijn. Op basis van deze informatie kan men besluiten nemen over het gebruik van stoffen. Men kan dan vaststellen wat de maximale hoeveelheden van stoffen mogen zijn waaraan we worden blootgesteld, zonder dat deze gevaar opleveren voor de gezondheid.

Voor deze toxiciteitstesten worden alleen in Europa al miljoenen dieren per jaar gebruikt (2). Deze dierproeven brengen verschillende bezwaren met zich mee. Ten eerste zijn er mensen die »



Positive Discovery

Welcome to a world in which every research model is designed to enhance a life – a world in which animal care is of paramount importance and our customers are at the heart of everything we do at Envigo.

Working together with our customers, Envigo is creating the foundations to a world in which human lives are improved and scientific knowledge is advanced on a daily basis.

Discover your own positive outcomes at Envigo today.

envigo.com



envigo.com



ethische bezwaren tegen het gebruik van proefdieren hebben. Een tweede probleem is dat dierproeven veel geld kosten. Een ander mogelijk probleem van het gebruik van dierproeven is dat de effecten die in dieren worden gevonden niet altijd relevant of goed voorspellend zijn voor de mens. Daarom wordt er veel onderzoek gedaan naar methoden die als alternatief kunnen dienen voor de dierproeven in de toxicologische risicobeoordeling.

Als alternatieve methoden worden vaak *in vitro* modellen gebruikt om uit te zoeken of stoffen toxische effecten veroorzaken. Deze *in vitro* modellen kunnen nuttige informatie geven over de toxische eigenschappen van een stof, maar ze worden vaak nog niet geaccepteerd als alternatief voor dierproeven, en worden daarom nog niet toegepast in de toxicologische risicobeoordeling. Een belangrijke reden daarvoor is dat de *in vitro* modellen alleen aangeven bij welke concentratie er een toxisch effect ontstaat, terwijl er voor het vaststellen van veilige blootstellingsniveaus voor mensen informatie nodig is over de dosis (bijvoorbeeld een bepaalde inname via de mond) die een toxisch effect veroorzaakt. Als je *in vitro* data wilt gebruiken voor de risicobeoordeling, moeten de toxische concentraties dus vertaald worden naar toxische doses. Promotieonderzoek van Jochem Louisse van Wageningen Universiteit, in samenwerking met TNO en de Universiteit Utrecht heeft laten zien dat deze vertaalslag mogelijk is door het gebruik van computermodellen.

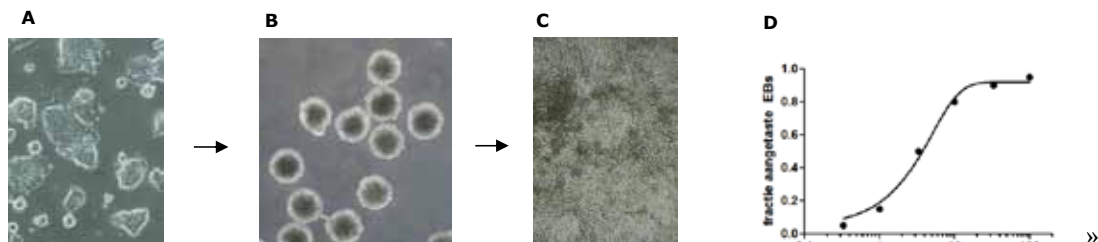
Voorspelling van *in vivo* ontwikkelingstoxiciteit door vertaling van *in vitro* toxische concentraties naar *in vivo* toxische doses

De onderzoekers hebben voor verschillende stoffen laten zien dat het mogelijk is om zonder dierproeven te gebruiken een goede schatting te maken van de doses die ontwikkelingstoxiciteit veroorzaken. Dit hebben ze gedaan door toxische effectconcentraties uit *in vitro* testen te vertalen naar voorspelde *in vivo* toxische doses met behulp van computermodellen.

De *in vitro* test die de onderzoekers voor ontwikkelingstoxiciteit hebben gebruikt is de embryonale stamceltest. Deze test maakt gebruik van embryonale stamcellen die in een 3D-structuur groeien en die uit kunnen groeien tot kloppende hartspiercellen (afb. 1). De test meet bij welke concentratie van een bepaalde stof de differentiatie van stamcellen tot kloppende hartspiercellen wordt geremd. Dit is een *in vitro* uitleesparameter voor ontwikkelingstoxiciteit.

Met behulp van computermodellen (het digitale proefdier) kunnen de toxische concentraties uit de embryonale stamceltest vertaald worden naar doses in de rat en in de mens (afb. 2). Dit zijn voorspelde toxische doses die ontwikkelingstoxiciteit veroorzaken. Deze voorspelde toxische doses kunnen gebruikt worden om in de toxicologische risicobeoordeling veilige blootstellingsniveaus vast te stellen.

Afbeelding 1. Embryonale stamceltest. De embryonale stamceltest bepaalt de concentratie van de teststof die de differentiatie van stamcellen (A) tot kloppende hartspiercellen (C) via het 'embryoid body' (EB) stadium (B) remt. De concentratie-afhankelijke remming van deze differentiatie (uitgedrukt in fractie aangetaste EBs, D) wordt gebruikt als *in vitro* eindpunt voor ontwikkelingstoxiciteit.



Brains On-Line is een jong onderzoeksbedrijf waar preklinisch onderzoek wordt uitgevoerd voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen gericht tegen ziektes van het centraal zenuwstelsel.

Het bedrijf is gevestigd in de stad Groningen

Wij zoeken op korte termijn een Biotechnicus

Je werkt in een team van biotechnici dat verantwoordelijk is voor het uitvoeren van experimenten waarbij verschillende in-vivo technieken worden toegepast. Het team werkt continue aan het verfijnen en optimaliseren van technieken.

Wat wij vragen:

- **Je bent in het bezit te zijn van de wettelijk vereiste certificaten**
- **Je kan goed zelfstandig en in teamverband werken**
- **Ervaring met microchirurgie is wenselijk**

Arbeidsvoorwaarden:

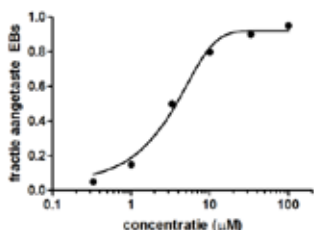
- **full-time aanstelling**
- **salaris afhankelijk van leeftijd en werkervaring**
- **wij bieden een jaarcontract met de mogelijkheid tot een vaste aanstelling**

**Sollicitatiebrief met C.V. graag richten aan:
info@brains-online.com**

***Voor meer informatie
over deze vacature
kunt u contact
opnemen met:
Gunnar Flik
050-3171440***



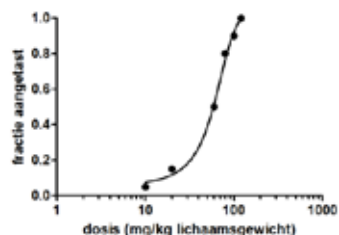
in vitro concentratie-respons



'digitaal proefdier'



in vivo dosis-respons



Afbeelding 2. Schematische weergave van de vertaling van een concentratie-respons curve naar een voorspelde in vivo dosis-respons curve. De voorspelde in vivo dosis-respons curve zou gebruikt kunnen worden om veilige blootstellingslevels van stoffen te bepalen. Met deze aanpak is het mogelijk om in vitro data te gebruiken voor de toxicologische risicobeoordeling van stoffen.

De onderzoeksgroep in Wageningen heeft laten zien dat de voorspelde ontwikkelingstoxiciteit van glycol ethers (3), phenol (4), retinoic acid (5) en tebuconazole (6) in de rat goed overeenkomen met gemeten ontwikkelingstoxiciteit in ratten. Dit laat zien dat de aanpak werkt en dat deze aanpak het mogelijk maakt om (meer) gebruik te maken van *in vitro* data in de toxicologische risicobeoordeling van stoffen.

Het digitale proefdier: computermodellen die kinetiek beschrijven

De computermodellen die de onderzoekers gebruiken zijn zogenaamde PBK modellen. PBK staat voor het Engelse *'physiologically based kinetic'* wat aangeeft dat dit modellen zijn die de kinetiek van stoffen beschrijven gebaseerd op fysiologisch relevante parameters. Als we een stof binnenkrijgen bepalen kinetische processen hoeveel van een stof uiteindelijk in ons bloed en in organen terecht komt en hoe lang de stof daar blijft. Deze kinetische processen zijn bijvoorbeeld de opname van de stof uit de darm naar de poortader en de afbraak van de stof in de lever. Door deze processen te beschrijven in een computermodel kun je de interne concentraties van stoffen voorspellen bij verschillende blootstellingen en op verschillende tijdstippen. De Wageningse onderzoekers hebben deze modellen gebruikt om toxische concentraties uit *in vitro* testen te vertalen naar toxische doses in ratten en in mensen. Dit is mogelijk door de toxische concentraties uit de *in vitro* testen als input in de modellen te gebruiken en de modellen te laten berekenen welke dosis er nodig is om de toxische concentratie in het bloed en daarmee het embryo te bereiken. Door elke concentratie te vertalen naar een corresponderende dosis, kun je een volledige concentratie-respons curve vertalen naar een voorspelde in vivo dosis-respons curve (afb. 2).

Voor de ontwikkeling van de PBK modellen is input-data nodig. Een deel van deze data is stof-specifiek, bijvoorbeeld de opnamesnelheid van de stof in de darm, de afbraak (of bioactivatie) in de lever en de uitscheiding via de nieren. Er zijn verschillende *in vitro* methoden beschikbaar om parameterwaarden te verkrijgen voor de beschrijving van deze kinetische processen. Ook zijn er methoden om op basis van de fysisch-chemische eigenschappen van een stof een schatting te maken van deze parameterwaarden. Echter, niet voor alle kinetische processen zijn methoden aanwezig om goede inputdata te verkrijgen. Er zijn bijvoorbeeld geen goede *in vitro* modellen beschikbaar om parameterwaarden te bepalen voor de uitscheiding van stoffen via de nieren. Daarom is het soms nog nodig om dierstudies te gebruiken om deze waarden te schatten. Om de ontwikkeling van PBK modellen te verbeteren zonder gebruik te maken van proefdieren is het belangrijk dat er goede in vitro modellen worden ontwikkeld voor het bepa- »

len van parameterwaarden voor kinetische processen, zoals voor de uitscheiding van stoffen via de nieren.

Verdere ontwikkeling van de aanpak

Om het vertrouwen in de aanpak te vergroten is het belangrijk dat er voor meer stoffen en voor meer toxicologische eindpunten voorbeelden komen die laten zien dat *in vivo* toxiciteit goed kan worden voorspeld door *in vitro* modellen met computermodellen te combineren. Momenteel gebruikt de groep in Wageningen deze aanpak om nefrotoxiciteit te voorspellen. Ook willen de onderzoekers deze aanpak toepassen om cardiotoxiciteit te voorspellen.

Bij voldoende vertrouwen in de aanpak, kunnen *in vitro* toxiciteitsdata gebruikt worden in de risicobeoordeling van stoffen. Door PBK modellen te gebruiken die de kinetiek van stoffen in de mens beschrijven, kan zelfs direct een schatting worden gemaakt van de toxiciteit van stoffen in mensen en hoeft er geen vertaalslag van proefdier naar mens worden gemaakt. De aanpak levert daarmee een belangrijke bijdrage aan de vermindering en mogelijk vervanging van proefdiergebruik in de toxicologische risicobeoordeling.

Referenties

1. <http://www.proefdierenalt.nl/willyvanheumenprijs.html>
2. European Commission (EC) (2013). *Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union COM(2013) 859 final*. Brussels
3. Louisse J, de Jong E, van de Sandt JJ, et al. (2010). *The use of in vitro toxicity data and physiologically based kinetic modeling to predict dose-response curves for in vivo developmental toxicity of glycol ethers in rat and man*. *Toxicological Sciences* 118: 470-484
4. Strikwold M, Spenkelink B, Woutersen RA, et al. (2013). *Combining in vitro embryotoxicity data with physiologically based kinetic (PBK) modelling to define in vivo dose-response curves for developmental toxicity of phenol in rat and human*. *Archives of Toxicology* 87: 1709-1723
5. Louisse J, Bosgra S, Blaauboer BJ, et al. (2015). *Prediction of in vivo developmental toxicity of all-trans-retinoic acid based on in vitro toxicity data and in silico physiologically based kinetic modeling*. *Archives of Toxicology* 89: 1135-1148
6. Li H, Zhang M, Vervoort J, et al. (2015). *Prediction of in vivo developmental toxicity of tebuconazole in rats using physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry of in vitro toxicity data*. In preparation. «

