

1978
1.572.534

2019
448.656

De 3V's: verleden, heden, toekomst

De 3V's: wat voorafging

Voor de proefdierkundige wereld was 1959 een belangrijk jaar, al besepte niemand dat destijds. Reden was het verschijnen van het boek 'The Principles of Humane Experimental Technique', een uitgave van de Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) uit Engeland. In dit boek introduceren de auteurs Bill Russell en Rex Burch het 3V-concept: Vervanging, Vermindering en Verfijning als uitgangspunt voor het humaner maken van dierexperimenteel onderzoek. De 3V's zouden ons denken over en werken met proefdieren veranderen, maar pas jaren na publicatie van het boek.

Coenraad F.M. Hendriksen

Emeritus-hoogleraar Alternatieven voor dierproeven, Universiteit Utrecht

De aandacht voor het onderwerp was eind jaren '50 minimaal en Russell en Burch gingen ieder hun eigen weg, Russell als hoogleraar in de sociologie (en deeltijd quizmaster bij de BBC!) en Burch als microbioloog met een klein eigen lab in een uithoek van het Verenigd Koninkrijk. Het boek werd uiteindelijk weer 'ontdekt' in de jaren '70 toen menig heilig huisje op de schop ging; de tijd van verzet tegen de gevestigde orde, inclusief het wetenschappelijk onderzoek en het daarbij behorende omvangrijke proefdiergebruik. Het was in die periode dat ik, na een studie diergeneeskunde, aan mijn loopbaan in het dierenlab begon. Overigens zonder me een goed beeld gevormd te hebben van wat me te wachten zou staan. Vanuit het nu is het moeilijk meer voor te stellen, maar in de jaren '70 kon een onderzoeker aan het eind van de middag dieren bestellen voor de volgende dag zonder dat naar het 'waarvoor' gevraagd werd, ratten zaten vaak in draadbodemkooien en ontwikkelden klompvoetjes en in letale proeven was het eindpunt in de regel de natuurlijke dood en niet een humane -vroeg- dood.

De 3V's herontdekt

Een belangrijk kantelpunt vormde de implementatie van de Wet op de dierproeven (Wod) in 1977. Het 3V-concept was in deze wet het raamwerk waar veel van de bepalingen, direct of indirect, aan werden opgehangen. Om enkele voorbeelden te geven: het verbod een dierproef te verrichten wanneer een 3V-alternatief aanwezig was (art.10), een vergunningplicht voor dierexperimenteel onderzoek op basis van een advies door de dierexperimentencommissie (DEC) (art 2), adequate verzorging en behandeling van dieren (art.12) of de verplichting een proefdierdeskundige aan te stellen voor het toezicht op het welzijn van de proefdieren (art.14). In 1986 zorgde de invoering van Directive 86/609/EEC voor een verdere wettelijke versteviging van het 3V-gedachtengoed, onder andere resulterend in een institutionalisering van dat gedachtengoed. Twee voorbeelden daarvan zijn het instellen van het Nationaal Centrum Alternatieven voor dierproeven (NCA) bij de universiteit Utrecht en het European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) van het EU-Joint Research Centre in Italië. Inmiddels kennen de meeste landen in de wereld een wetgeving op het gebied van dierproeven en onveranderlijk staan daarin de 3V's centraal. Dat laat onverlet dat het Europese beleid het verst gaat in het centraal stellen van het dierenwelzijn, onder andere door de erkenning dat dieren pijn kunnen ervaren en een intrinsieke waarde hebben.

Veertig jaar Vermindering en Verfijning

Wat heeft pakweg 40 jaar 3V-beleid opgeleverd? Het is maar hoe je de vraag bekijkt. Zoals Afbeelding 1 laat zien is het aantal dierproeven de afgelopen 40 jaar spectaculair gedaald, maar die daling zit toch vooral in de eerste twee decennia. Daarna wisselen afname en toename elkaar af met een lichte tendens tot daling. De afvlakking rondom de eeuwwisseling wordt vooral toegeschreven aan het beschikbaar komen van genetisch gemodificeerde dieren, maar misschien moet je ook constateren dat tegen het einde van de vorige eeuw het meeste laaghangende 3V-fruit was 'geoogst'. Dat dat kon gebeuren is een prestatie op zich geweest met een cruciale rol voor het beleid, de DEC's, en binnen de instellingen de onderzoekers, biotechnici en proefdierdeskundigen. Basale vragen die voor de introductie van de Wod praktisch nooit werden gesteld ("heb je voor die wetenschappelijke vraag echt dieren nodig en zo ja, kan het niet met minder dieren en waarom wordt er geen pijnstilling of humaan eindpunt gebruikt") waren nu de standaard. Onderzoekers bedachten zich wel twee keer om met een slecht onderbouwd voorstel te komen en anders sneuvelde dat voorstel wel bij de behandeling door de DEC. Ook zijn de 40 jaar vruchtbaar geweest op het vlak van vermindering en verfijning. Draadbodemkooien bestaan al lang niet meer en zijn vervangen door macrolonbakken met bedding en voldoende kooiverrijking, de verzorging van de dieren is geprofessionaliseerd door gerichte scholing en bijscholing en humane eindpunten zijn gemeengoed geworden in het beperken van het lijden in de laatste fase van het leven van het dier. Het gaat te ver om te concluderen dat de 'culture of care' in alle dierlaboratoria optimaal geïmplementeerd is, maar er zijn grote stappen gezet.

Vervanging is toch een ander verhaal

En dan de proefdiervervangende methoden? Alles overziend kun je alleen maar concluderen dat de oogst hiervan in de afgelopen decennia beperkt is. Elk tijdvak bood nieuwe uitdagingen en vooral hoge verwachtingen; van een simpele celkweek, naar co-culturen, monoclonale antilichamen, -omics-technologieën en stamcellen. Niet zelden lieten onderzoekers zich in de media verleiden tot weinig realistische uitspraken over de besparingen die het alternatief zou kunnen opleveren en eerlijk gezegd heb ik me daar ook wel eens schuldig aan gemaakt. Veel van deze 'vervangende' alternatieven hebben een plaats gevonden als screeningstest, bijvoorbeeld in de geneesmiddelenontwikkeling, maar geselecteerde stoffen zullen dan alsnog getest moeten worden in het dier. Dat neem niet weg dat er klassieke en aansprekende voorbeelden van proefdiervervangende alternatieven te vinden zijn, zoals de twee methoden die in de box hier beneden beschreven staan. De ene betreft de ascitesmethode voor de productie van monoclonale antilichamen; een methode die ik persoonlijk als een van de meest dierbelastende heb beschouwd. Het andere voorbeeld is de pyrogeentest in het geneesmiddelenonderzoek.

Transitie naar proefdiervrije methoden

In 2010 is in Europa Directive 86/609/EEC vervangen door Directive 2010/63/EU en is in 2014 in ons land de Wod overeenkomstig herzien. Betekent de nieuwe wetgeving nu een nieuw kantelpunt in ons denken over en gebruik van proefdieren? De Directive laat daarover geen misverstand bestaan; de stip aan de horizon is proefdiervrije wetenschap. Ook in Nederland staat dit streven hoog op de politieke agenda, zoals blijkt uit het NCad advies 'Transitie naar dierproefvrij onderzoek' (2016) van het NCad (Nationaal Comité advies dierproefbeleid) en de instelling van de netwerkorganisatie TPI; Transitie Proefdiervrije Innovatie. Kortweg zijn er twee overwegingen die aan dit streven naar een proefdiervrije wetenschap ten grondslag liggen: innovatie en translatie.

De laatste jaren zijn nieuwe innovatieve proefdiervrije methoden beschikbaar gekomen zoals 3D-in vitro-modellen (organoid culturen en de Organs-on-a-chip). Deze modellen hebben een

complexere structuur dan de 'oudere' *in vitro* methoden en zijn vaak gebaseerd op het gebruik van humane (stam)cellen. Dat maakt de transeerbaarheid van het onderzoek naar de mens beter, is de achterliggende gedachte. En dat is nu net de achilleshiel van dierproeven: een rat is geen klein mensje. De laatste twee bijeenkomsten van het Harry Blom-beraad (over dag-/nachtsritme en over het microbiom) maakten weer eens duidelijk hoe lastig het extrapoleren is van de resultaten van dierstudies naar de mens. Een proefdiervrije wetenschap heeft potentie en toekomst, zondermeer. Daarin zou realisme op zijn plaats moeten zijn, maar generalisatie ('one size fits all') is vaak de praktijk. Een organoid-cultuur bijvoorbeeld kan heel goed gebruikt worden om hartspierschade door stof X aan te tonen maar het wordt al een stuk moeilijker om met een organoid-cultuur de effectiviteit van een nieuw vaccin te bestuderen.

Kennis om het complexe immuunsysteem in een organoid-culturen te integreren is nog beperkt. En wat voor diermodellen geldt, geldt ook voor veel proefdiervrije methoden. Zo kunnen resultaten van organoid-studies beïnvloed worden door zaken als celtypen, differentiatie van cellen of gebrek aan standaardisatie en ook voor *in vitro* methoden geldt het probleem van translatie, zelfs als met menselijke cellen gewerkt wordt. Het is dan ook te simpel om te stellen dat de mogelijkheden voor proefdiervrije wetenschap er zijn maar dat het faalt in de implementatie. Een vergelijkbare discussie speelt bij nieuwe onderzoeksstrategieën waarbij de resultaten van *in vitro*-onderzoek direct gelinkt kunnen worden aan betrouwbare humane data, zonder tussenkomst van het dier. Deze benadering is zowel wetenschappelijk als ethisch het meest aantrekkelijk. Maar voorwaarde is wel dat de humane data beschikbaar zijn en dat is lang niet altijd het geval. Ook hier geldt de kanttekening dat wat in het ene gebied van de wetenschap mogelijk is niet automatisch betekent dat dit ook voor een ander gebied geldt.

Conclusies

Velen zouden het willen, maar transitie naar proefdiervrij onderzoek zal zeker niet langs de lijnen van een revolutie plaats vinden. Het zal eerder evolutie zijn met verschillende snelheden voor de onderzoeksterreinen. Voordeel is wel dat we tegenwoordig mogelijkheden kennen om de evolutie te versnellen. Dat moet dan wel gericht en doordacht gebeuren, onder andere door goed overheidsbeleid. Conclusie is dat we voorlopig (nog) niet zonder dierproeven kunnen. In dat licht is een opmerking van Russell en Burch over de 3V's nog steeds actueel: "Don't put all the eggs in the basket of Replacement". Met andere woorden: als we constateren dat we nog niet zonder dierproeven kunnen, dan is het investeren in verfijningsonderzoek geen luxe maar bittere noodzaak!

Twee voorbeelden van proefdiervervangende alternatieven.

1. De ascites-methode kent twee stappen: in het eerste stap worden, na immunisatie van enkele muizen met antigeen, uit de milt van deze dieren de voor het antigeen specifieke plasmacellen geïsoleerd. Deze cellen worden gefuseerd met myeloom (kanker)-cellen, wat een hybride antilichaam-producerende kankercel oplevert. In de tweede stap worden deze zogenaamde hybridoomcellen intraperitoneaal ingespoten bij de muis. Vervolgens gaat de tumor hoge concentratie monoclonale antilichamen produceren dat zich, vermengd met vocht (ascites), in de buikholte ophoopt. Als dieren niet tijdig getapt worden sterven ze door druk van de tumor op middenrif en longen. De ascitesmethode is inmiddels obsoleet in veel - maar niet alle landen - in de wereld) en vervangen door *in vitro*-productie.

Momenteel staat ook de eerste stap (immunisatie) ter discussie omdat er volgens verschillende groepen (waaronder ECVAM) proefdiervrije alternatieven zijn.

2. Onderzoek op pyrogeniteit is een standaardtest in het geneesmiddelenonderzoek. Als een geneesmiddel als bijwerking koorts opwekt komt dit door een verontreiniging van het geneesmiddel met endotoxinen. De klassieke in vivo-test voor onderzoek op pyrogenen was het konijn. Voor veel typen geneesmiddelen is de konijntest intussen vervangen door de Limulus Amebocyte Lysaat (LAL)-test waarbij gebruikt gemaakt wordt van de eigenschap van bloed van de degenkrab (*Limulus polyphemus*) om in contact met endotoxine te gaan klonteren. Inmiddels wordt op veel plaatsen de LAL-test vervangen door een nieuwe in vitro-test op basis van humane monocytten.

Afbeelding 1. Vermindering van het aantal dierproeven per jaar.

Jaar	Aantal*	Jaar	Aantal*
1978	1.572.534	1999	723.816
1979	Niet beschikbaar	2000	745.064
1980	1.486.639	2001	714.449
1981	1.448.015	2002	724.025
1982	1.422.094	2003	620.875
1983	1.329.497	2004	633.155
1984	1.242.285	2005	612.809
1985	1.175.088	2006	603.741
1986	1.208.539	2007	597.605
1987	1.131.128	2008	607.207
1988	1.062.676	2009	592.665
1989	1.010.919	2010	575.278
1990	951.200	2011	589.853
1991	876.058	2012	589.956
1992	797.400	2013	526.593
1993	780.703	2014	621.000
1994	770.888	2015	528.159
1995	746.726	2016	449.874
1996	741.174	2017	530.568
1997	712.650	2018	448.399
1998	674.353	2019	448.656

*Jaarrapportages (Zo doende) van de Veterinaire Hoofdinspectie en NVWA.