



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

**Knelpunten in de keten van 3V-testen voor
ontwikkelings- en reproductietoxiciteit**
Plan van Aanpak

RIVM briefrapport 340008002/2012
R.J. Vandebriel | J.W. van der Laan | A.H. Piersma



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Knelpunten in de keten van 3V-testen voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit

Plan van Aanpak

RIVM Briefrapport 340008002/2012

R.J. Vandebriel | J.W. van der Laan | A.H. Piersma

Colofon

ISBN:

© RIVM 2012

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Rob Vandebriel, Centrum Gezondheidsbescherming, RIVM
Jan Willem van der Laan, Centrum Gezondheidsbescherming, RIVM; College ter
Beoordeling van Geneesmiddelen
Aldert Piersma, Centrum Gezondheidsbescherming, RIVM

Contact:

Rob Vandebriel
Centrum Gezondheidsbescherming, RIVM
rob.vandebriel@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van VWS, in het kader van V/340080/12/AB.

Rapport in het kort

In de keten van validatie, acceptatie en implementatie van 3V-testen zijn in de Programmeringsstudie en het RIVM-rapport 'Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven' de context van diverse toepassingsdomeinen en de knelpunten daarin beschreven. Uit deze studies blijkt dat voor het wegnemen van deze knelpunten een ketengerichte aanpak nodig is. Deze aanpak houdt in dat in elke fase van de keten van onderzoek tot implementatie van 3V-testen, alle ketenpartners worden betrokken.

Voor de kennisvraag wordt jaarlijks een keuze gemaakt voor één toepassingsdomein om daarin het functioneren van de keten te optimaliseren. In dit domein worden drempels geïdentificeerd en acties benoemd om deze drempels te verlagen; hiertoe wordt een plan van aanpak gemaakt.

Voor 2013 is gekozen voor het toepassingsdomein ontwikkelings- en reproductietoxicologie; de argumenten voor deze keuze worden gegeven. De vooruitgang in de innovatie van risicobeoordeling en alternatieve methoden, worden besproken voor dit domein, evenals de verbinding tussen deze ontwikkelingen en de Programmeringsstudie en het "Actieplan Dierproeven en Alternatieven 2011-2021".

Het plan van aanpak is als volgt:

- in de EU lidstaten bevorderen van acceptatie van de "extended one generation reproductive toxicity test" door te (blijven) lobbyen in Brussel
- voor chemische stoffen nagaan of in studies naar ontwikkelingstoxiciteit een tweede species moet worden getest, en zo ja, onder welke omstandigheden dit geldt
- voor geneesmiddelen nagaan of in studies naar ontwikkelingstoxiciteit altijd in twee species moet worden getest en zo nee, onder welke omstandigheden dit geldt en voor welke species dan wordt gekozen
- bestaande gegevens uit de muizen Embryonale Stamcel Test vergelijken met bestaande gegevens uit studies naar ontwikkelingstoxiciteit met rat en konijn

Abstract

In the chain of validation, acceptance and implementation of 3R testing, in the "Programmeringsstudie" and the RIVM report "Bottlenecks in the development of validated tests, databases and assessment strategies based on Alternatives to Animal Experiments" the context of various application domains and the bottlenecks therein are described. These studies show that a chain-oriented approach is needed for the removal of these bottlenecks. This approach means that all chain partners are involved in every stage of the chain, from research to implementation of 3R testing.

For the "kennisvraag" each year a choice is made for a single application domain, in order to optimize the function of the chain in that domain. In this domain thresholds are identified and actions are named to lower these thresholds; in order to do so a plan of action is made.

For 2013 the application domain "developmental and reproductive toxicology" is chosen; the reasons for this choice are provided. For this domain the progress in the innovation of risk assessment and alternative methods are discussed, as well as the connection between these developments, the "Programmeringsstudie" and the "Actieplan Dierproeven en alternatieven 2011-2021".

The plan of action is as follows:

- Promote acceptance of the "extended one-generation reproductive toxicity test" in the EU Member States by (continued) lobbying in Brussels
- For chemicals, establish whether for developmental toxicity studies a second species needs to be tested, and if so, under what conditions this applies
- For drugs, establish whether for developmental toxicity studies drugs should always be tested in two species and if not, under what conditions this is true and which species should be selected
- Compare existing data from the mouse Embryonic Stem Cell Test with existing data from developmental toxicity studies in rat and rabbit

Inhoudsopgave

RAPPORT IN HET KORT	3
ABSTRACT	4
SAMENVATTING	7
1 INLEIDING	8
2 VOORUITGANG IN DE INNOVATIE VAN RISICOBEOORDELING EN ALTERNATIEVE METHODEN IN DE ONTWIKKELINGS- EN REPRODUCTIETOXICOLOGIE	9
2.1 RENDEMENT IN DE 3V's	9
2.2 ALTERNATIEF MODEL	9
2.3 DATABASES	10
2.4 VEELBELOVENDE TESTEN	10
2.4.1 <i>De muis embryonale stamcel test</i>	11
2.4.2 <i>Rat "whole embryonic cell culture" (rWEC)</i>	12
2.4.3 <i>Zebravis embryo kweek</i>	13
2.4.4 <i>Humane embryonale stamcellen test (hEST)</i>	13
2.4.5 <i>'omics'</i>	14
2.5 TESTSTRATEGIEËN	14
3 VERBINDING RISICOBEOORDELING EN ALTERNATIEVE METHODEN IN DE ONTWIKKELINGS- EN REPRODUCTIETOXICOLOGIE MET PROGRAMMERINGSSTUDIE EN ACTIEPLAN	16
3.1 PRIORITAIRE KENNISDOMEINEN EN SPECIFIEKE KENNISBEHOEFTEEN	16
3.2 KETENBETROKKENHEID (ACTIEPLAN P.14)	16
3.3 ONDERZOEK NAAR DE BRUIKBAARHEID VAN ALTERNATIEVE METHODEN IN HET KADER VAN CLASSIFICATIE & ETIKETTERING VAN CHEMISCHE STOFFEN (ACTIEPLAN P.22)	16
3.4 EVALUATIE VAN DE VOORSPELLENDE WAARDE VAN VEILIGHEIDSTESTEN MET PROEFDIEREN BIJ DE ONTWIKKELING VAN GENEESMIDDELEN EN DE BESCHIKBARE ALTERNATIEVEN VOOR DEZE TESTS. DAARTOE WORDEN GENEESMIDDELDOSSIERS, RICHTSNOEREN VAN DE REGISTRATIEAUTORITEITEN EN ONGEWENSTE EFFECTEN NA MARKTTOELATING IN RELATIE MET DE GEBRUIKTE DIERPROEVEN, BESTUDEERD (ACTIEPLAN P.24)	17
3.5 INBRENG VANUIT HET CBG IN DE ICH EN DE ZOGENAAMDE "LEARNED SOCIETIES". REDUCTIE VAN DE TWEEDE SOORT STUDIE OP HET GEBIED VAN GENEESMIDDELEN DOOR INZET VAN IN VITRO MODELLEN (ACTIEPLAN P.25-26)	17
3.6 PARADIGMASHIFT (ACTIEPLAN P.16)	17
3.7 ONTWIKKELEN VAN ALTERNATIEVE TESTEN VOOR TOXICOLOGISCHE EINDPUNTEN. IN VITRO - IN VIVO EXTRAPOLATIE (ACTIEPLAN P.22)	18
3.8 ONTWIKKELING ALTERNATIEVE METHODEN GEBASEERD OP 'OMICS TECHNIEKEN (ACTIEPLAN P.25) 18	
4 ARGUMENTATIE VOOR DE KEUZE VOOR ONTWIKKELINGS- EN REPRODUCTIETOXICOLOGIE ALS TOEPASSINGSDOMEIN	19
4.1 OPTIMALISATIE VAN HET FUNCTIONEREN VAN DE (TOTALE) KETEN	19
4.2 GROOTSE KANS OP SUCCES EN/OF HOOGSTE RENDEMENT (T.O.V. ANDERE KETENS)	19
4.3 VERBETERING T.O.V. HET FUNCTIONEREN VAN DE TOTALE KETEN?	19
4.4 AANSLUITING BIJ ACTIEPLAN?	20
4.5 AANSLUITING BIJ KNELPUNTENRAPPORT?	20
4.6 CRITERIA VOOR DE KEUZE VAN HET TOEPASSINGSDOMEIN?	20
5 PLAN VAN AANPAK	22
5.1 EOGRT	22

5.2	DATABASE TWEDE SPECIES ONTWIKKELINGSTOXICITEIT CHEMISCHE STOFFEN	22
5.3	DATABASE TWEDE SPECIES ONTWIKKELINGSTOXICITEIT GENEESMIDDELEN	22
5.4	EMBRYONALE STAMCELTEST TWEDE SPECIES ONTWIKKELINGSTOXICITEIT	22
6	REFERENTIES	23

Samenvatting

In de keten van validatie, acceptatie en implementatie van 3V-testen zijn in de Programmeringsstudie en het RIVM rapport "Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven" de context van verschillende toepassingsdomeinen en de knelpunten daarin beschreven. Deze studies geven aan dat een ketengerichte aanpak nodig is voor het wegnemen van deze knelpunten. Deze aanpak houdt in dat alle ketenpartners worden betrokken bij elke fase van de keten, van onderzoek tot implementatie van 3V-testen.

Voor de kennisvraag wordt jaarlijks gekozen voor één toepassingsdomein, om daar het functioneren van de keten te optimaliseren. In dit domein worden drempels geïdentificeerd en acties benoemd om deze drempels te verlagen; hiertoe wordt een plan van aanpak gemaakt.

Voor 2013 is het toepassingsdomein ontwikkelings- en reproductie toxicologie gekozen; de argumenten voor deze keuze worden gegeven. Voor dit domein worden de vooruitgang in de innovatie van risicobeoordeling en alternatieve methoden besproken, evenals de verbinding tussen deze ontwikkelingen, de Programmeringsstudie en het "Actieplan Dierproeven en Alternatieven 2011-2021".

Het plan van aanpak is als volgt:

- Het bevorderen van de acceptatie van de "extended one generation reproductive toxicity test" in de EU-lidstaten door (te blijven) lobbyen in Brussel
- Voor chemische stoffen, vast te stellen of voor studies naar ontwikkelingstoxiciteit een tweede species moet worden getest, en zo ja, onder welke voorwaarden dit geldt
- Voor geneesmiddelen, vast te stellen of voor studies naar ontwikkelingstoxiciteit altijd in twee species moet worden getest en zo niet, onder welke voorwaarden dit dan geldt en welke species moet worden gekozen
- Vergelijking van bestaande gegevens van de muis Embryonale Stamcel Test met bestaande gegevens van studies naar ontwikkelingstoxiciteit bij ratten en konijnen

1 Inleiding

In de keten van validatie, acceptatie en implementatie van 3V-testen zijn in de Programmeringsstudie (Deleu et al., 2010; Deleu & van Boxel, 2011) en in het RIVM-rapport 'Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven' (Vandebriel & Opperhuizen, 2011) de context van diverse toepassingsdomeinen en de knelpunten daarin beschreven. Tot de knelpunten behoort in ieder geval steeds het functioneren van de totale keten. In dit laatste moet verbetering worden gebracht.

Jaarlijks wordt een keuze gemaakt voor één toepassingsdomein om daarin het functioneren van de keten te optimaliseren. De keuze voor een domein wordt gebaseerd op de grootste kans op succes en/of het hoogste rendement. In dit domein worden drempels geïdentificeerd en acties benoemd om deze drempels te verlagen. Hiertoe wordt een plan van aanpak gemaakt. In dit plan wordt zoveel mogelijk invulling en uitwerking gegeven aan het Actieplan Dierproeven en alternatieven 2011-2021.

In de voorliggende rapportage wordt in Hoofdstuk 2 de vooruitgang in de innovatie van risicobeoordeling en alternatieve methoden in de ontwikkelings- en reproductietoxicologie besproken. Vervolgens wordt in Hoofdstuk 3 de verbinding gelegd tussen deze ontwikkelingen, prioritaire gebieden genoemd in de Programmeringsstudie en activiteiten genoemd in het Actieplan. In Hoofdstuk 4 worden de argumenten voor de keuze voor het toepassingsdomein ontwikkelings- en reproductietoxicologie benoemd vanuit de kennisvraag. Tenslotte wordt in Hoofdstuk 5 het Plan van Aanpak gegeven.

2 **Vooruitgang in de innovatie van risicobeoordeling en alternatieve methoden in de ontwikkelings- en reproductietoxicologie**

In dit hoofdstuk wordt de voortuitgang in de innovatie van risicobeoordeling en alternatieve methoden in de ontwikkelings- en reproductietoxicologie besproken aan de hand van de in de kennisvraag genoemde aandachtspunten.

2.1 **Rendement in de 3V's**

Voor het testen van stoffen binnen het REACH programma wordt naar schatting 65% van de dieren gebruikt voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit; 38% voor de twee-generatie test voor reproductietoxiciteit (OECD TG 416) en 23% voor de test voor ontwikkelingstoxiciteit (OECD TG 414) (van der Jagt et al., 2004). De overige 4% wordt gebruikt voor screening op ontwikkelingstoxiciteit (OECD TG 421). Vooral voor de eerste twee testen wordt hard gewerkt aan alternatieven; voor de twee-generatie test is inmiddels een door de OECD geaccepteerd alternatief beschikbaar, de extended-one generation reproductive toxicity (EOGRT) test (OECD TG 443; zie 2.2), terwijl voor de test voor ontwikkelingstoxiciteit diverse initiatieven lopen die elkaar aanvullen (zie 2.3).

De EOGRT geeft een reductie van het aantal proefdieren van 2600 naar 1400 per test; deze test heeft verder als voordeel boven de twee-generatie test dat effecten op de ontwikkeling van het immuunsysteem en het neurale systeem worden meegenomen. Beide systemen zijn in de perinatale fase gevoeliger voor toxiciteit dan in de postnatale fase (van Loveren & Piersma, 2004; Rice & Barone, 2000).

Het is nog onduidelijk in welke mate alternatieve testen voor ontwikkelingstoxiciteit aanleiding kunnen geven tot vermindering van het aantal proefdieren. In deze test worden in het geval van geneesmiddelen altijd twee species getest, knaagdier (rat) en niet-knaagdier (konijn), in het geval van chemische stoffen hangt dit af van de verdere informatie over de stof. Zowel voor geneesmiddelen als voor chemische stoffen worden databases gevuld met bestaande data, waaruit retrospectief moet blijken of met één species kan worden volstaan voor risicoschatting en classificatie & labeling. Per species per test gaat het om 1200 dieren.

2.2 **Alternatief model**

De haalbaarheid van vervanging van de twee-generatie test door de EOGRT in termen van mogelijke gevolgen voor risicobeoordeling en classificatie & etikettering zijn bevestigd in uitgebreid onderzoek dat gebruik maakt van internationale databases (Piersma et al., 2011; Rorije et al., 2011). Daarnaast worden nieuwe parameters voor gevoelige eindpunten van ontwikkelingsimmunotoxiciteit en -neurotoxiciteit opgenomen in de EOGRT, waarmee de gevoeligheid en efficiëntie van het testen worden verhoogd. Ofschoon de EOGRT is geaccepteerd als een OESO richtlijn, is deze test nog steeds onderwerp van uitgebreide discussie in de EU met betrekking tot de aanvaardbaarheid als een alternatief voor de twee-generatie studie in de REACH wetgeving. Met het op handen zijn van enkele honderden generatie studies, vanwege de deadlines binnen REACH, is deze discussie van onmiddellijk belang, met een direct gevolg voor het aantal proefdieren dat gebruikt zal gaan worden binnen REACH. De situatie geeft dus aan dat wettelijke acceptatie in de

regelgeving niet wordt bereikt door acceptatie door de OESO alleen. Overheden die wetgeving op het gebied van toxicologie uitoefenen, bepalen de laatste fase van implementatie.

2.3 Databases

Voor de ontwikkeling van geneesmiddelen is het testen voor ontwikkelingstoxiciteit op twee species, een knaagdier (rat) en een niet-knaagdier (konijn), een basisvereiste. Voor de beoordeling van "hazard" bij chemische stoffen kan een test op ontwikkelingstoxiciteit voor een tweede species worden gevraagd, van geval tot geval afhankelijk van bestaande kennis. Voor wat betreft geneesmiddelen is tijdens een brainstormsessie van de ICH in Tallinn (2010) de vraag gerezen of het testen op de rat of het konijn (of beide) noodzakelijk is voor het vaststellen van ontwikkelingstoxiciteit. Voor wat betreft chemische stoffen is de vraag gerezen in welke mate de tweede species (het konijn) bijdraagt aan risicobeoordeling en classificatie & etikettering (veelal wordt de rat als eerste species getest). Om deze vragen te beantwoorden, worden twee databases gebouwd in samenwerking tussen het RIVM en internationale partners waaronder de US "Environmental Protection Agency" (EPA) en het "International Life Sciences Institute"- "Health and Environmental Sciences Institute" (ILSI-HESI), één database op het gebied van geneesmiddelen en één op het gebied van chemische stoffen en pesticiden.

De chemische stoffen database wordt geanalyseerd op de toegevoegde waarde van de tweede species. Een voorlopige analyse van publiek beschikbare gegevens over verbindingen die zijn geclassificeerd voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit is recent gepubliceerd (Rorije et al., 2012). Deze analyse heeft retrospectief de beperkte toegevoegde waarde van de tweede species aangetoond en zal naar verwachting leiden tot voorstellen voor het wijzigen van internationale voorschriften voor het testen. Aangezien een test op ontwikkelingstoxiciteit (maximaal) 1400 ratten of konijnen kan beslaan, betekent het niet uitvoeren van één test een aanzienlijke proefdierbesparing, naast het verminderen van tijd en kosten en een toegenomen testefficiëntie.

De geneesmiddelendatabase wordt gebouwd om de volgende vragen te kunnen beantwoorden:

1. In welke mate zijn ratten of konijnen achteraf gezien doorslaggevend geweest bij de evaluatie van geneesmiddelen?
2. Op welke manier zijn effecten bij ratten en konijnen gelijk of verschillend voor de verschillende klassen van geneesmiddelen (bijvoorbeeld antibiotica, dopamine-agonisten)?
3. Welke effecten op de ontwikkeling waren van cruciaal belang bij de evaluatie? Hoe hebben de gevoeligheid, incidentie, ernst en omvang een rol gespeeld in het vaststellen van "hazard"?

2.4 Veelbelovende testen

Het reductionistische karakter van in vitro testen, evenals bestaande gegevens uit de validatie van verschillende in vitro benaderingen, geven aan dat dergelijke testen geen volledige vervanging van in vivo testen voor ontwikkelings- en reproductietoxiciteit kunnen geven (van der Laan et al., 2012). Wel kan worden verwacht dat de testen, gecombineerd in testbatterijen en toegepast voordat de keuze voor in vivo testen wordt gemaakt, kunnen bijdragen aan het verminderen van de noodzaak voor dierproeven. Om dit doel te bereiken, is overleg tussen regelgevers, industrie en academische wetenschappers nodig. Dit is een belangrijk aandachts- en actiepoint van (onder andere) de directie DAD van ELI. Ter ondersteuning van dat overleg is uitwisseling van informatie over bestaande testen en hun stand van ontwikkeling en evaluatie van essentieel belang. Dit vindt op diverse gremia plaats: wetenschappelijke publicaties,

congressen, internationale gremia zoals de OECD, de “European Medicines Agency” (EMA) en de US “Food and Drug Administration” (FDA).

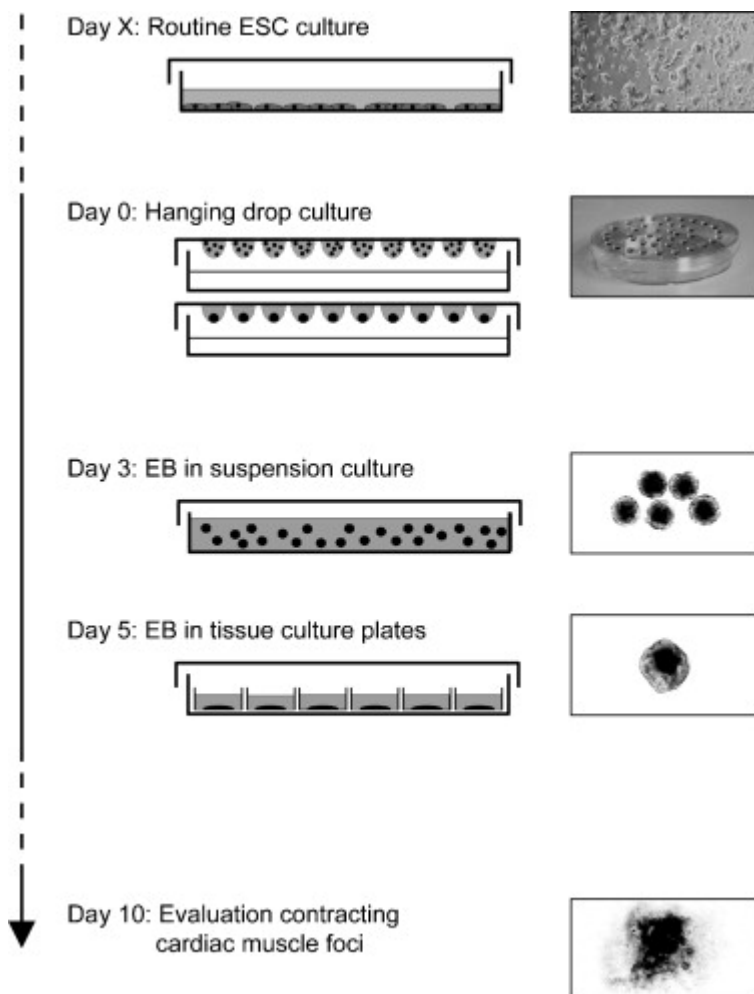
Belangrijk voor het gebruik van deze testen is de bijdrage aan belangrijke beslissingen, zoals het includeren van vrouwen in vruchtbare leeftijd in Fase III trials. Veel fabrikanten hebben intuïtief deze testen al toegepast, maar daarna nog ter bevestiging de vereiste dierstudies gedaan.

Een ander aandachtspunt is de extrapolatie van in vitro naar in vivo blootstelling. Een aantal studies geeft mogelijkheden aan op basis van kinetiek (De Jong et al., 2009; Louisse et al., 2010).

2.4.1 *De muis embryonale stamcel test*

Pluripotente embryonale stamcellen van de muis kunnen worden geïnduceerd om in vitro te differentiëren tot een groot aantal celtypen, waaronder hartspiercellen. Deze differentiatieroute vormt de basis van de embryonale stamcel test (EST; Spielmann et al., 1997). Er is voor hartspiercellen gekozen vanwege de gemakkelijke visuele identificatie van contracterende cellen in gedifferentieerde stamcelkweken. Bovendien is de in vitro differentiatie van hartspiercellen uitgebreid onderzocht en gestandaardiseerd. Met behulp van de “hanging drop” kweektechniek, vormen de stamcellen meercellige aggregaten, “embryoid bodies” genoemd. Deze primitieve structuren lijken op een 5 dagen oud embryo. Binnen de “embryoid bodies” kunnen alle drie de kiembladen, endo-, ecto- en mesoderm gevormd worden. Verdere differentiatie kan worden geïnduceerd door gedurende 2 dagen te kweken in suspensie, gevolgd door uitplaten in weefselkweekplaten. Deze kweekmethode leidt tot diverse gedifferentieerde cellen, waaronder contracterende hartspiercellen. Remming van de differentiatie wordt bepaald door microscopische inspectie van contracterende hartspiercellen op dag 10 van differentiatie. Het effect van blootstelling aan een chemische stof of geneesmiddel, op de differentiatie van stamcellen in hartspiercellen wordt beschouwd als een maat voor toxiciteit van verbindingen. Een schematisch overzicht wordt gegeven in de figuur op pagina 11.

De muis EST (mEST) heeft al in 2001 een validatie in overeenstemming met ECVAM-criteria ondergaan (Seiler et al., 2002; Genschow et al., 2002). Deze validatie was gebaseerd op 20 chemische stoffen. De test was goed reproduceerbaar tussen 4 laboratoria en de correlatie tussen in vitro en in vivo gegevens was vrij goed (78%). De test was toepasbaar voor een reeks van stoffen, met 100% voorspelbaarheid voor sterke embryotoxische stoffen, maar met een lagere voorspelbaarheid voor zwakke (70%) en niet-embryotoxische stoffen (70%). De conclusie was dat de test aanvaardbaar was voor regelgevende doeleinden, maar niet als een één-op-één vervanging voor proefdierstudies. Uit verdere evaluatie met behulp van een tweede reeks van teststoffen bleek een slechte voorspelbaarheid (Marx-Stoelting et al., 2009). De ECVAM “Scientific Advisory Committee” (ESAC) besloot toch dat er meer werk moest worden gedaan om de toepasbaarheid van de methode te verbeteren. De zwakke punten van deze validatie zijn de aard van het wiskundige voorspellingsmodel en de onzekerheid over het “applicability domain” van de test. Onder “applicability domain” wordt hier verstaan de biologische processen en de stofklassen, waarvoor de test een relevant resultaat geeft. Daarom blijft, ondanks deze validatie, de voorspellende waarde van de test onzeker. Veel laboratoria proberen de test te verbeteren door eindpunten toe te voegen of analytische methoden te wijzigen en dus zijn de eindpunten en methoden voor de mEST nog niet gestandaardiseerd.



De mEST wordt ook ontwikkeld als een “high throughput” screen met differentiële genexpressie als eindpunt, met inbegrip van de mogelijkheid van een kortere blootstellingduur (Van Dartel et al., 2010). Deze aanpak maakt een bredere beoordeling van effecten op de embryonale celdifferentiatie mogelijk en een betere evaluatie van het “applicability domain” van de mEST.

2.4.2 Rat “whole embryonic cell culture” (rWEC)

De rat “whole embryonic cell culture” (rWEC) test is gebaseerd op de kweek van rattenembryo’s tussen dag 10 en 12 van ontwikkeling (New, 1978). Tijdens deze periode van embryogenese vindt een groot gedeelte van het morfogenetische proces van organogenese plaats. Het hart wordt gevormd en begint te slaan, de neurale buis sluit en vormt verschillende vroege compartimenten van de hersenen, en het ruggenmerg. De gesegmenteerde structuur van de wervelkolom wordt gevormd, en craniofaciale structuren ontwikkelen zich, net als de eerste stadia van ontwikkeling van ledematen. De ontwikkeling van elk van deze structuren kan worden gevolgd tijdens de kweek. In deze fase is het embryo nog steeds onafhankelijk van de placenta en ontwikkelt het zich nagenoeg op dezelfde wijze als in vivo.

De ontwikkeling van elk van de orgaananlagen kan morfologisch worden gecoördineerd, en de effecten van chemische stoffen kunnen worden beoordeeld (Piersma et al., 1995; Genschow et al., 2002). Het embryo ontwikkelt zich los van de moeder en dit biedt voordelen omdat alleen directe effecten worden bestudeerd; het embryo is onafhankelijk van toxiciteit bij het moederdier.

Bovendien kan de concentratie van de chemische stof in het kweekmedium makkelijker gerelateerd worden aan de dosis in het embryo dan in het geval van in vivo embryotoxiciteitsonderzoek. Ondanks het feit dat deze methode bewerkelijk en tijdrovend is, wordt deze al decennia lang gebruikt als een alternatief model voor embryotoxiciteitstesten. Differentiële genexpressie wordt nu gebruikt ter aanvulling om embryotoxiciteit op een meer gedetailleerde en mechanistisch manier te onderzoeken (Luijten et al., 2010; Robinson et al., 2011), wat het voorspellende vermogen van de methode verhoogt.

2.4.3 *Zebravis embryo kweek*

Zebravissen zijn de laatste tijd een populair testmodel geworden, vanwege conservering van de genetische opmaak ten opzichte van de mens, en de overeenkomsten tussen enkele ziekteprocessen in beide soorten (Lieschke & Currie, 2007; Lam et al., 2006). Daarnaast hebben ze vele praktische voordelen: klein formaat, transparantie en goed beschreven morfogenese. Ze worden veel gebruikt in de fundamentele biologie omdat hun genetische opmaak gemakkelijk is te manipuleren in ovo. Daarnaast maakt hun kleine formaat en de gemakkelijk te monitoren effecten op de morfologie relatief "high throughput" testen van chemische stoffen mogelijk voor een verscheidenheid aan effecten (Oppedal & Goldsmith, 2010). Omdat embryo's een structuur vormen en afwijkingen van het normale gemakkelijk kunnen worden waargenomen, zijn veel publicaties verschenen die hun gebruik als screen voor teratogeniciteit beschrijven (Selderslagh et al., 2012; McCollum et al., 2011; Brannen et al., 2010; Yang et al., 2009; Busquet et al., 2008), hoewel er geen één methode zich heeft ontpopt als een dominante of consensus methode. Het feit dat zelfs vroege embryo's tot fase 1 metabolisme in staat zijn en pro-teratogenen te transformeren tot actieve stoffen (Weight et al., 2011) wijst op een vermogen dat meestal niet gevonden wordt in in vitro systemen. Anderzijds worden tot 20% van de verbindingen toegevoegd aan het water buiten het zebravis ei gehouden, ongeacht of de buitenste chorion aanwezig is of niet. Dit betekent dat stoffen die negatief testen in een zebravis test voor teratogeniciteit, moeten worden gemeten in de embryo's om blootstelling vast te stellen. Concluderend heeft de zebravis een aantal uitzonderlijk aantrekkelijke eigenschappen, maar liggen er ook nog een aantal belangrijke uitdagingen. De zebravis lijkt een veelbelovend model dat zich nog moet vestigen in een niche van "optimaal gebruik".

2.4.4 *Humane embryonale stamcellen test (hEST)*

Een in vitro model dat is afgeleid van humane embryonale stamcellen, is mogelijk een beter in vitro model voor wat betreft voorspelling voor de mens dan een test op basis van cellen van de muis. De humane embryonale stamcel WA09 cellijn is goedgekeurd voor toepassing in de Verenigde Staten en de Europese Unie. Neurale differentiatie van deze cellen is op het RIVM succesvol tot stand gebracht. Op basis hiervan wordt een momenteel een protocol ontwikkeld waarin een tiental chemische stoffen wordt getest op remming van de neurale differentiatie.

Het is van belang om te begrijpen hoe een test voor ontwikkelingstoxiciteit gebaseerd op humane embryonale stamcellen het best kan worden gebruikt ten behoeve van de 3 V's. Het inpassen van deze en andere testen in een teststrategie is nodig omdat de voorspelling van schadelijke effecten op basis van gecombineerde data van verschillende testen waarschijnlijk beter is dan op basis van één enkele test. Een dergelijke benadering zou in de toekomst kunnen leiden tot een substantiële vermindering van proefdiergebruik.

2.4.5 'omics'

De voorspellende waarde van alternatieve testen en de extrapolatie van testresultaten naar "hazard" en "risk" bij de mens zijn uitdagingen bij de ontwikkeling van alternatieve methoden. In vitro parameters zijn vaak moeilijk te extrapoleren naar de mens, bij afwezigheid van mechanistische informatie die kan worden gebruikt om de relevantie van in vitro parameters voor de mens te bepalen. Daarom heeft het RIVM sterk ingezet op moleculaire methoden voor het bepalen van effecten van chemische stoffen in alternatieve testen. Dit is gedaan voor verschillende gebieden binnen de toxicologie, waaronder ontwikkelingstoxicologie (Piersma et al., 2012; Robinson et al., 2012; Hermsen et al., 2011; van Dartel et al., 2011). In het bijzonder, 'omics technieken worden toegepast voor het monitoren van effecten van chemische stoffen in vitro om "toxicity pathways" vast te stellen. Binnen de ontwikkelingstoxicologie worden vooral de muis embryonale stamcel test, de rat "whole embryonic cell culture" en de zebrafish embryo kweek bestudeerd met deze techniek. Dit heeft geleid tot lijstjes van 3 tot 50 genen (verschillende lijstjes voor verschillende testen) die kunnen worden gebruikt om embryotoxische effecten van stoffen vast te stellen. Dit wordt beschouwd als een belangrijke eerste stap op weg naar voorspellende profielen, die alle essentiële "toxicity pathways" in de embryogenese moeten omvatten. Een dergelijke benadering is zinvol met het oog op een toekomst waarin dierproeven tot het minimum worden beperkt, en mechanistische voorspelling van "hazard" en "risk" voor de mens op basis van "adverse outcome pathways" gemeengoed is. Deze benadering past bij de "Toxicology in the 21st Century" visie van de Amerikaanse "National Academy of Sciences" (Krewski et al., 2010).

2.5 Teststrategieën

Een wezenlijk aspect van de optimale benutting van alternatieve testen is hun plaats binnen een teststrategie. In veel gebieden van toxiciteitstesten wordt één enkele in vitro test niet in staat geacht om alle essentiële "adverse outcome pathways" te omvatten. Daarom is een combinatie van complementaire testen noodzakelijk voor de essentiële minimale vereisten voor adequate voorspelling van toxiciteit. In de teststrategie kan dit leiden tot "tiered" en "battery" benaderingen waarbij eenvoudige "high throughput" testen vooraf gaan aan meer complexe assays. Beslissingen over de noodzaak van elke test worden bepaald op basis van eerdere kennis van andere tests en in silico informatie.

In het EU-FP7 ChemScreen project wordt een dergelijke strategie ingericht, beginnend met in silico informatie met inbegrip van fysisch-chemische eigenschappen en structuur-activiteit relaties. Dit wordt gevolgd door een batterij van in vitro testen, die een voldoende filter zouden moeten vormen om te voorkomen dat stoffen met aangetoonde ontwikkelingstoxiciteit in vivo worden getest (van der Burg et al., 2011). Gezien de veelheid en ingewikkeldheid van processen in de reproductiecyclus is het ondoenlijk om alle reproductietoxische eindpunten en hun onderliggende mechanismen terug te laten komen in alternatieve testen. De uitdaging is om een selectie van in vitro testen te maken die idealiter alle stoffen met een reprotoxisch of ontwikkelingstoxisch risico detecteert (van der Burg et al., 2011). Identificatie van de eindpunten die essentieel zijn geweest in risicoschatting leidt tot prioritering van in vitro testen. De EPA ToxRef database is gebruikt voor retrospectieve analyses van de relatieve gevoeligheid van diverse eindpunten (Janer et al., 2007; Dang et al., 2009; Knudsen et al., 2009; Martin et al., 2009; Piersma et al., 2011).

Het OECD "Guidance Document" 43 definieert een geïntegreerde teststrategie met 4 niveaus met toenemende informatie en complexiteit van testen.

Een teststrategie voor de reproductietoxische eigenschappen van geneesmiddelen, DECIDART, is voorgesteld door van der Laan et al. (2012). In deze strategie wordt een stapsgewijze benadering gekozen. De eerste stap is een combinatie van de resultaten van een mEST en de farmacodynamische eigenschappen van de stof. Dit zou een Fase I studie kunnen voorkomen. De tweede stap is een in vivo studie in één species (rat, soms het konijn), die voorafgaand aan een Fase III ("women of child bearing potential") wordt gepland. Een tweede dierstudie ter bevestiging (vaak het konijn) wordt voorafgaand aan markttoelating gepland. Als op termijn de tweede species overbodig blijkt, kan een eerste "tier" bestaan uit in vitro testen en een tweede "tier" uit een in dierstudie met slechts één species.

Sommige bedrijven hebben al een lange ervaring met de mEST, maar nog nooit gedeeld met regelgevende instanties. Beslissingen zijn genomen door bedrijven op basis van resultaten met de mEST, maar de betrouwbaarheid van deze resultaten is onbekend. Het wordt aanbevolen deze testen verder te ontwikkelen zodanig dat ze kunnen worden gebruikt voor regelgevende beslissingen, bijvoorbeeld voor risicobeoordeling tijdens de ontwikkeling van een geneesmiddel.

De FDA heeft het concept van een "Safe-Harbour" benadering ontwikkeld, waarbij fabrikanten worden gestimuleerd om hun gegevens over de ervaring met mEST en andere in vitro-benaderingen te delen met de FDA zonder dat daar regelgevende beslissingen uit kunnen voortvloeien. Op deze manier kunnen regelgevende instanties ook kennis opdoen over het gebruik van deze testen.

3 **Verbinding risicobeoordeling en alternatieve methoden in de ontwikkelings- en reproductietoxicologie met Programmeringsstudie en Actieplan**

In dit hoofdstuk wordt de verbinding gelegd tussen de innovatie in de risicobeoordeling en alternatieve methoden op het domein van ontwikkelings- en reproductietoxicologie en de prioritaire gebieden genoemd in de Programmeringsstudie en activiteiten genoemd in het Actieplan. Dit wordt gedaan aan de hand van de in beide documenten genoemde aandachtspunten.

3.1 **Prioritaire kennisdomeinen en specifieke kennisbehoeften**

Ontwikkeling, maar zeker ook validatie, acceptatie en implementatie van 3V methoden voor het vaststellen van ontwikkelings- en reproductietoxiciteit, valt onder twee van de vier prioritaire kennisdomeinen zoals vermeld in de Programmeringsstudie:

- "Fundamenteel onderzoek naar de ontwikkeling van geneesmiddelen" (Programmeringsstudie 2^e deel; hoofdstuk 4). Hieronder valt de specifieke kennisbehoefte "Onderzoek naar de voorspellende waarde van dierproeven" (p.26)
- "Toegepast onderzoek naar de risicobeoordeling van chemische stoffen" (Programmeringsstudie 2^e deel; hoofdstuk 5). Hieronder vallen: "Evaluatie (regulatoir verplichte) testen", "Ontwikkeling geïntegreerde teststrategieën in Europees verband inclusief modelleren" en "Case studies met betrekking tot de toepassing van nieuwe 3V-methoden" (p.32).

3.2 **Ketenbetrokkenheid (Actieplan p.14)**

In het Actieplan wordt de ketenbetrokkenheid genoemd: naast de wetenschappelijke basis, waarvoor Prof. Piersma (RIVM, IRAS) het aanspreekpunt is, worden de activiteiten in de keten getrokken door Dr. Hakkert (RIVM; Nationaal Coördinator OECD) op het gebied van chemische stoffen en Dr. van der Laan (College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG)-"Medicines Evaluation Board" en EMA-"Safety Working Party") op het gebied van geneesmiddelen.

3.3 **Onderzoek naar de bruikbaarheid van alternatieve methoden in het kader van classificatie & etikettering van chemische stoffen (Actieplan p.22)**

Door Dr. Hakkert en Prof. Piersma wordt sterk gelobbyd voor de EOGRT bij de EU en haar lidstaten.

Door Dr. Hakkert en Prof. Piersma wordt onderzocht of voor chemische stoffen ontwikkelingstoxiciteit altijd in een tweede species moet worden nagegaan en zo ja, onder welke omstandigheden dit geldt. Lobbyen voor aanscherping van de regels, met als doel vermindering van proefdiergebruik gebeurt bij de EU en haar lidstaten.

3.4 Evaluatie van de voorspellende waarde van veiligheidstesten met proefdieren bij de ontwikkeling van geneesmiddelen en de beschikbare alternatieven voor deze tests. Daartoe worden geneesmiddelendossiers, richtsnoeren van de registratieautoriteiten en ongewenste effecten na markttoelating in relatie met de gebruikte dierproeven, bestudeerd (Actieplan p.24)

Door Dr. van der Laan en Prof. Piersma wordt onderzocht of voor geneesmiddelen ontwikkelingstoxiciteit altijd in twee species moet worden nagegaan en zo nee, onder welke omstandigheden dit geldt en welke species dan niet hoeft te worden getest. Het aanklaarten van voorstellen voor wijziging en updating van de regels, met als doel vermindering van proefdiergebruik gebeurt bij de "International Conference on Harmonization" (ICH).

Ter ondersteuning van het beantwoorden van deze vraag wordt een database gebouwd. Deze benadering is analoog aan die welke in het verleden voor de EOGRT is gebruikt (Janer et al., 2007). De database wordt gevuld met informatie van de EMA, FDA en "Pharmaceuticals and Medical Devices Agency" (PMDA; Japan), die samen de 3 regelgevende partijen binnen de ICH vormen. Dit maakt het mogelijk om de resultaten verkregen met het proefdier later te vergelijken met resultaten in de mens. Tevens zal worden nagegaan of alternatieve methoden, vooral de mEST, ingezet kunnen worden om tot een geïntegreerde teststrategie te komen, die op termijn tot een verdere vermindering van het testen van de tweede species moet leiden.

3.5 Inbreng vanuit het CBG in de ICH en de zogenaamde "Learned Societies". Reductie van de tweede soort studie op het gebied van geneesmiddelen door inzet van in vitro modellen (Actieplan p.25-26)

Naast het inbrengen bij de ICH (zie 3.4.) worden de resultaten ook ingebracht in publieke wetenschappelijke meetings ("European Teratology Society", US "Society of Toxicology") en mogelijk een workshop van de DIA, om wetenschappelijke uitkomsten te toetsen, te brainstormen over de in te brengen wijzigingen in de regelgeving, hiervoor draagvlak te zoeken, om zo het proces bij de ICH zoveel mogelijk te versoepelen.

3.6 Paradigmashift (Actieplan p.16)

In de paradigmashift zoals beschreven in de "Toxicology in the 21st Century" visie van de Amerikaanse "National Academy of Sciences", is het oude paradigma een op proefdier testen gebaseerde analyse van een (noodzakelijkerwijs) beperkt aantal stoffen, getest in hoge doseringen.

Het nieuwe paradigma is een op mechanistische kennis ("toxicity pathways") gebaseerde analyse van een groot aantal stoffen (inclusief mengsels en formuleringen), getest in lage doseringen. In principe wordt voor elke "toxicity pathway" een in vitro test voorzien, zodat een grote reeks testen wordt gebruikt, liefst in "high throughput" formaat, met een hoge informatiedichtheid en gebaseerd op cellen van humane oorsprong (Andersen & Krewski, 2009). De testresultaten worden met "systems biology" modellen geanalyseerd. Extrapolatie van in vitro naar in vivo is gebaseerd op farmacokinetische modellen.

Het uitgangspunt zal veel meer de stof zelf zijn en geïntegreerde teststrategieën worden gebruikt. Het gebruik van menselijk lichaamsmateriaal past in deze visie.

De hiervoor beschreven alternatieve methoden op het gebied van reproductie- en ontwikkelingstoxiciteit passen bij een paradigmashift, onder meer door (1) uitgebreide validatie van alternatieve methoden op basis van een database met de testgegevens (en intrinsieke stofgegevens) van honderden stoffen, leidend tot een goed begrip van het "applicability domain" van de alternatieve test, (2) combinatie van in vitro en in vivo methoden in een geïntegreerde teststrategie en (3) ondersteuning van in vitro methoden met 'omics technieken volgens de "Toxicology in the 21st Century" visie van de Amerikaanse "National Academy of Sciences", waarbij deze resultaten zowel informatie geven over "toxicity pathways" die in de in vitro methode besloten liggen als gedetailleerde resultaten per teststof die nauwkeurig de toxiciteit kan voorspellen.

3.7 Ontwikkelen van alternatieve testen voor toxicologische eindpunten. In vitro - in vivo extrapolatie (Actieplan p.22)

Bij het vergelijken van een reeks verwante stoffen met ontwikkelingstoxiciteit bleek de volgorde van de relatieve sterkte van deze stoffen gemeten met de mEST vergelijkbaar met de volgorde volgens beschikbare in vivo gegevens (De Jong et al., 2009). Het combineren van in vitro concentratie - respons gegevens uit de mEST met in silico PBK modellering tot in vivo dosis - respons relatie gaf een goede voorspelling van de in vivo gegevens (Louisse et al., 2010).

3.8 Ontwikkeling alternatieve methoden gebaseerd op 'omics technieken (Actieplan p.25)

Binnen de ontwikkelingstoxicologie worden de mEST, de rat "whole embryonic cell culture" en de zebra vis embryo kweek bestudeerd met 'omics technieken. Dit onderzoek wordt ondersteund door het Nederlands Toxicogenomics Centrum (NTC).

4 **Argumentatie voor de keuze voor ontwikkelings- en reproductietoxicologie als toepassingsdomein**

De hier besproken argumenten staan vermeld in de kennisvraag (2012).

4.1 **Optimalisatie van het functioneren van de (totale) keten**

De verschillende elementen van de keten; ontwikkeling, validatie, acceptatie en implementatie dienen zoveel mogelijk in één hand te liggen. Dit betekent bij ontwikkeling en zeker wanneer besloten wordt tot validatie, dat er voldoende zekerheid moet zijn dat, als de validatie succesvol¹ verloopt, de test wordt geaccepteerd en geïmplementeerd. De potentiële toepasbaarheid moet dus in een vroeg stadium worden beoordeeld. Andersom wordt vanuit implementatie en zeker vanuit acceptatie, aangegeven dat de test een essentiële rol in risicobeoordeling/veiligheidsonderzoek vervult en wat de voorwaarden zijn voor succesvolle validatie.

Op het gebied van reproductie- en ontwikkelingstoxicologie gaat het bij chemische stoffen en bij geneesmiddelen om nauwe samenwerking tussen wetenschapper, regelgever op het chemische stoffen domein, regelgever op het geneesmiddelen domein, en deskundige op het gebied van ITS. Al deze individuen zijn gezaghebbend op hun terrein. Zo worden de ketens maximaal bestreken.

Op het gebied van implementatie (ECHA) dient de keten nog gesloten te worden; dit geldt echter voor alle terreinen van de toxicologie.

¹Onder succesvolle validatie wordt hier verstaan dat (1) aan alle - in feite voor elke test relevante - aspecten aandacht wordt besteed en dat (2) de specifieke test het "goed doet" t.a.v. deze criteria. Zie publicatie Piersma (<http://axlr8.eu/> pp. 227-232) voor relevante aspecten van validatie.

4.2 **Grootse kans op succes en/of hoogste rendement (t.o.v. andere ketens)**

"Toegepast onderzoek naar de risicobeoordeling van chemische stoffen" is één van de vier velden genoemd in het prioriteringsschema van de programmeringsstudie.

Aangezien in het REACH programma 65% van het aantal proefdieren wordt gebruikt voor reproductie- en ontwikkelingstoxicologie is het verwachte rendement, in ieder geval binnen het domein van de chemische stoffen, daar het grootst. Vervanging van de twee-generatiestudie door de EOGRT levert een reductie op van 15% op het totale REACH programma; concreet gaat het dus om miljoenen dieren. NB: de twee-generatiestudie (of EOGRT) is niet vereist voor het domein van de geneesmiddelen. Op verdere terugdringing van het aantal proefdieren wordt ingezet door retrospectief onderzoek naar de tweede species in ontwikkelingstoxiciteit. Dit laatste geldt zowel voor het domein van chemische stoffen als geneesmiddelen.

Het retrospectief nagaan van de uitkomsten van dierproeven met het doel deze als test te evalueren, wordt aanbevolen in de programmeringsstudie.

4.3 **Verbetering t.o.v. het functioneren van de totale keten?**

Onderwerpen die genoemd zijn in het 1^e deel van de programmeringsstudie:

- beëindigen ontwikkelingsproces 3V alternatieven die niet zullen leiden tot implementatie en toepassing (p.34)

- gestructureerde feedback uit de keten; degenen die zich met implementatie bezighouden moeten standaard worden betrokken bij de voorafgaande processtappen (p.36)
- sturen vooraf (p.36)
- leren achteraf (p.37)
- verzamelen van informatie uit het verleden over nut en noodzaak van dierproeven (p.37)
- gezaghebbende intermediairs (p.38)

Zoals onder 4.1 aangegeven is de organisatie van de reproductie- en ontwikkelingstoxicologie op het RIVM zodanig dat voor het chemische stoffen domein en het geneesmiddelen domein de situatie gunstig is om de gehele keten in beide richtingen te doorlopen: regelgevers worden in een vroeg stadium op de hoogte gesteld van nieuwe 3V alternatieven, ze geven aan welke daarvan naar hun inschatting potentie hebben en in samenwerking met de onderzoekers stellen ze vast welke informatie nodig is uit de validatie zodanig dat deze afdoende is voor de beslissing over opname als richtlijn. Ook heeft deze groep sterke interactie met internationale gremia als OECD (stoffen) en EMA, FDA en ILSI/HESI (geneesmiddelen). Zowel in het verleden bij de EOGRT als momenteel bij het nagaan van de noodzaak voor het testen van een tweede species bij ontwikkelingstoxiciteit is/wordt gebruik gemaakt van retrospectief onderzoek op grond van bestaande data uit dierstudies.

De weerbaarheid van de acceptatie van de EOGRT door ECHA (EU) is een leermoment.

Nu lopende acties: acceptatie EOGRT door ECHA (interactie met OECD en ECHA); onderzoek nut tweede species in ontwikkelingstoxiciteit (interactie met OECD resp. EMA/FDA/PMDA); opname mEST in ITS voor ontwikkelingstoxiciteit.

4.4 Aansluiting bij actieplan?

De in het actieplan genoemde aandachtspunten die relevant zijn voor de reproductie- en ontwikkelingstoxicologie zijn in Hoofdstuk 3 besproken.

4.5 Aansluiting bij knelpuntenrapport?

Zoals onder 4.1 aangegeven is de organisatie van de reproductie- en ontwikkelingstoxicologie op het RIVM zodanig dat voor het chemische stoffen domein en het geneesmiddelen domein de situatie gunstig is om de gehele keten in beide richtingen te doorlopen.

Acceptatie EOGRT door ECHA blijft een aandachtspunt.

4.6 Criteria voor de keuze van het toepassingsdomein?

Twee van de vijf onderzoeksgebieden die als kansrijk zijn aangemerkt in de programmeringsstudie zijn van toepassing in het domein van de ontwikkelings- en reproductietoxicologie: "Fundamenteel onderzoek naar de ontwikkeling van geneesmiddelen" (2^e deel, p.22) en "Toegepast onderzoek naar de risicobeoordeling van chemische stoffen" (2^e deel, p.27).

In het beoordelingskader worden drie groepen van prioriteringscriteria genoemd (1^e deel, p.18-20):¹

- **Omvang:** aantal dieren (diersoort, ongerief)
- **Slagingskans:** technische mogelijkheden, aanwezige relevante onderzoeksfocus, korte-termijn doelen
- **Impact:** strategische benadering versus modelontwikkeling, specifieke technieken, efficiëntie, internationale profilering, internationale spin-off

¹Onderstreept: meer dan gemiddeld gewicht. Tussen haakjes: minder dan gemiddeld gewicht.

5 Plan van aanpak

5.1 EOGRT

In de EU lidstaten bevorderen van acceptatie van de EOGRT door te (blijven) lobbyen in Brussel. *Gefinancierd door het ministerie van I&M.*

5.2 Database tweede species ontwikkelingstoxiciteit chemische stoffen

Voor chemische stoffen wordt nagegaan of in studies naar ontwikkelingstoxiciteit een tweede species moet worden getest, en zo ja, onder welke omstandigheden dit geldt. Hiertoe wordt een database gevuld met bestaande data uit dit type studies met ratten en konijnen, waaruit retrospectief moet blijken welke species van belang was (of waren) voor risicoschatting en classificatie & etikettering. Deze resultaten worden gepubliceerd in een "peer reviewed" tijdschrift, waarna deze in internationale gremia (EU en "European Chemicals Agency") onder de aandacht worden gebracht. Bij de EU wordt gelobbyd om de regelgeving zo aan te passen, dat waar mogelijk overgegaan wordt op het testen van één species. *De ontwikkeling database chemische stoffen wordt gefinancierd door het ministerie van I&M. Informatie wordt verkregen van EPA, ILSI-HESI en REACH. Wetenschappelijke publicatie verwacht medio 2014.*

5.3 Database tweede species ontwikkelingstoxiciteit geneesmiddelen

Voor geneesmiddelen wordt nagegaan of in studies naar ontwikkelingstoxiciteit altijd in twee species moet worden getest en zo nee, onder welke omstandigheden dit geldt en voor welke species dan wordt gekozen. Hiertoe wordt een database gevuld met bestaande data uit dit type studies met ratten en konijnen, waaruit retrospectief moet blijken welke species van belang was (of waren) voor veiligheid. Deze resultaten worden gepubliceerd in een "peer reviewed" tijdschrift, waarna deze in internationale gremia (ICH) onder de aandacht worden gebracht. In deze gremia wordt gelobbyd om de regelgeving zo aan te passen, dat waar mogelijk overgegaan wordt op het testen van één species. *De ontwikkeling database geneesmiddelen wordt gefinancierd door SLIM en ILSI-HESI. Informatie wordt verkregen van CBG, EMA, FDA en ILSI-HESI. Wetenschappelijke publicatie verwacht januari 2014.*

5.4 Embryonale stamceltest tweede species ontwikkelingstoxiciteit

Bestaande gegevens uit de mEST worden vergeleken met bestaande gegevens uit studies naar ontwikkelingstoxiciteit met rat en konijn. Doel van deze vergelijking is retrospectief na te gaan of de resultaten uit de mEST informatie hadden kunnen geven over de vraag of het testen van één species voldoende was geweest en (in het geval van geneesmiddelen) zo ja, welke species. Dit zal vorm krijgen als een geïntegreerde teststrategie (ITS). Deze resultaten worden gepubliceerd in een "peer reviewed" tijdschrift, waarna deze in internationale gremia (EU, ICH) onder de aandacht worden gebracht. In deze gremia wordt gelobbyd om de regelgeving zo aan te passen, dat de mEST voorafgaand aan de dierstudie wordt uitgevoerd conform de ITS. *Op basis van de gegevens uit de bovengenoemde geneesmiddelen database wordt voor enkele tientallen stoffen (waar rat en konijn een duidelijk verschil te zien geven) de mEST uitgevoerd. Deze testen worden gefinancierd door SLIM. Wetenschappelijke publicatie verwacht in eind 2014.*

6 Referenties

- Actieplan Dierproeven en alternatieven 2011 – 2021.
<http://www.rijksoverheid.nl/bestanden/documenten-en-publicaties/rapporten/2011/12/28/actieplan-dierproeven-en-alternatieven-2011-2021/actieplan-dierproeven-en-alternatieven-2011-2021.pdf>
- M.E. Andersen, D. Krewski. Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life. *Toxicol Sci* 107 (2009) 324-330.
- K.C. Brannen, J.M. Panzica-Kelly, T.L. Danberry, K.A. Augustine-Rauch. Development of a Zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Res B* 89 (2010) 66–77.
- F. Busquet, R. Nagel, F. von Landenberg, S.O. Mueller, N. Heubler, T.H. Broschard. Development of a new screening assay to identify proteratogenic substances using *Danio rerio* embryo combined with an exogenous mammalian metabolic activating system (mDarT). *Toxicol Sci* 104 (2008) 177–188.
- Z.C. Dang, E. Rorije, T.H. Esch, A. Muller, B.C. Hakkert, A.H. Piersma. Retrospective analysis of relative parameter sensitivity in multi-generation reproductive toxicity studies. *Reprod Toxicol* 28 (2009) 196-202.
- E. De Jong, J. Louisse, M. Verwei, B.J. Blaauboer, H. Van de Sandt, R.A. Woutersen, I.M.C.M. Rietjens, A.H. Piersma. Relative developmental toxicity of glycol ether alkoxy acetic acid metabolites in the embryonic stem cell test as compared to the in vivo potency of their parent compounds. *Toxicol Sci* 110 (2009) 117–124.
- S.A.M. Deleu, M.M.F. van Boxel, D.P.K. Lankveld, R.J. Vandebriel, J.G.M. Bessems. Programmeringsstudie Alternatieven voor Dierproeven - Deel 1. Samen vervangen, verminderen en verfijnen. RIVM briefrapport 380001001. 2010. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/380001001.pdf>
- S. Deleu, M.M.F. van Boxel. Programmeringsstudie Alternatieven voor Dierproeven - Deel 2. Samen vervangen, verminderen en verfijnen. RIVM rapport 380001002. 2011. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/380001002.pdf>
- E. Genschow, H. Spielmann, G. Scholz, A. Seiler, N. Brown, A. Piersma, M. Brady, N. Clemann, H. Huuskonen, F. Paillard, S. Bremer, K. Becker. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern Lab Anim* 30 (2002) 151–176.
- S.A. Hermsen, T.E. Pronk, E.J. van den Brandhof, L.T. van der Ven, A.H. Piersma. Chemical class-specific gene expression changes in the zebrafish embryo after exposure to glycol ether alkoxy acids and 1,2,4-triazole antifungals. *Reprod Toxicol* 32 (2011) 245-252.
- G. Janer, B.C. Hakkert, W. Slob, T. Vermeire, A.H. Piersma. A retrospective analysis of the two-generation study: what is the added value of the second generation? *Reprod Toxicol* 24 (2007) 97-102.
- T.B. Knudsen, M.T. Martin, R.J. Kavlock, R.S. Judson, D.J. Dix, A.V. Singh. Profiling the activity of environmental chemicals in prenatal developmental toxicity studies using the U.S. EPA's ToxRefDB. *Reprod Toxicol* 28 (2009) 209-219.

- N.C. Kleinstreuer, A.M. Smith, P.R. West, K.R. Conard, B.R. Fontaine, A.M. Weir-Hauptman, J.A. Palmer, T.B. Knudsen, D.J. Dix, E.L. Donley, G.G. Cezar. Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicol Appl Pharmacol* 257 (2011) 111–121.
- D. Krewski, D. Acosta Jr, M. Andersen, H. Anderson, J.C. Bailar 3rd, K. Boekelheide, R. Brent, G. Charnley, V.G. Cheung, S. Green Jr, K.T. Kelsey, N.I. Kerkvliet, A.A. Li, L. McCray, O. Meyer, R.D. Patterson, W. Pennie, R.A. Scala, G.M. Solomon, M. Stephens, J. Yager, L. Zeise. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 13 (2010) 51-138.
- S.H. Lam, Y.L. Wu, V.B. Vega, L.D. Miller, J. Spitsbergen, Y. Tong, H. Zhan, K.R. Govindarajan, S. Lee, S. Mathavan, K.R. Krishna Murthy, D.R. Buhler, E.T. Liu, Z. Gong. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol* 24 (2006) 73–75.
- G.J. Lieschke, P.D. Currie. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8 (2007) 353–367.
- J. Louisse, E. De Jong, J.J.M. Van de Sandt, B.J. Blaauboer, R.A. Woutersen, A.H. Piersma, I.M.C.M. Rietjens, M. Verwei. 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. *Toxicol Sci* 118 (2010) 470–484.
- M. Luijten, V.A. van Beelen, A. Verhoef, M.F. Renkens, M.H. van Herwijnen, A. Westerman, F.J. van Schooten, J.L. Pennings, A.H. Piersma. Transcriptomics analysis of retinoic acid embryotoxicity in rat postimplantation whole embryo culture. *Reprod Toxicol* 30 (2010) 333–340.
- M.T. Martin, E. Mendez, D.G. Corum, R.S. Judson, R.J. Kavlock, D.M. Rotroff, D.J. Dix. Profiling the reproductive toxicity of chemicals from multigeneration studies in the toxicity reference database. *Toxicol Sci* 110 (2009) 181-190.
- P. Marx-Stoelting, E. Adriaens, H.J. Ahr, S. Bremer, B. Garthoff, H.P. Gelbke, A. Piersma, C. Pellizzer, U. Reuter, V. Rogiers, B. Schenk, S. Schwengberg, A. Seiler, H. Spielmann, M. Steemans, D.B. Stedman, P. Vanparys, J.A. Vericat, M. Verwei, F. van der Water, M. Weimer, M. Schwarz. A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST). The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Altern Lab Anim* 37 (2009) 313–328.
- C.W. McCollum, N.A. Ducharme, M. Bondesson, J.-A. Gustafsson. Developmental toxicity screening in Zebrafish. *Birth Defects Res C*, 93 (2011) 67–114.
- OECD Guidance Document 43 on Reproductive safety and assessment. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testingofchemicals/34030071.pdf>
- D. Oppedal, M.I. Goldsmith. A chemical screen to identify novel inhibitors of fin degeneration in Zebrafish. *Zebrafish* 7 (2010) 1–8.
- A.H. Piersma, P. Attenon, R. Bechter, M.J. Govers, N. Krafft, B.P. Schmid, J. Stadler, A. Verhoef, C. Verseil. Interlaboratory evaluation of embryotoxicity in the postimplantation rat embryo culture. *Reprod Toxicol* 9 (1995) 275–280.
- A.H. Piersma, E. Rorije, M.E. Beekhuijzen, R. Cooper, D.J. Dix, B. Heinrich-Hirsch, M.T. Martin, E. Mendez, A. Muller, M. Paparella, D. Ramsingh, E. Reaves, P. Ridgway, E. Schenk, L. Stachiw, B. Ulbrich, B.C. Hakkert. Combined retrospective analysis of 498 rat multi-generation reproductive toxicity studies: on the impact of parameters related to F1 mating and F2 offspring. *Reprod Toxicol* 31 (2011) 392–401.
- A.H. Piersma. Validation of alternative methods for toxicological hazard assessment – issues and challenges. Submitted.

- D. Rice, S. Barone Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3 (2000) 511-533.
- J.F. Robinson, P.T. Theunissen, D.A. van Dartel, J.L. Pennings, E.M. Faustman, A.H. Piersma. Comparison of MeHg-induced toxicogenomic responses across in vivo and in vitro models used in developmental toxicology. *Reprod Toxicol* 32 (2011) 180-188.
- J.F. Robinson, J.L. Pennings, A.H. Piersma. A review of toxicogenomic approaches in developmental toxicology. *Methods Mol Biol* 889 (2012) 347-371.
- E. Rorije, A. Muller, M.E.W. Beekhuijzen, U. Hass, B. Heinrich-Hirsch, M. Paparella, E. Schenk, B. Ulbrich, B.C. Hakkert, A.H. Piersma. On the impact of second generation mating and offspring in multi-generation reproductive toxicity studies on Classification and Labelling of substances in Europe. *Regul Toxicol Pharmacol* 6 (2011) 251-260.
- A. Seiler, A. Visan, I. Pohl, E. Genschow, R. Buesen, H. Spielmann. Improving the embryonic stem cell test (EST) by establishing molecular endpoints of tissue specific development using murine embryonic stem cells (D3 cells). *ALTEX* 19 (Suppl 1) (2002) 55-63.
- I.W.T. Selderslagh, R. Blust, H.E. Witters. Feasibility study of the Zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod Toxicol* 33 (2012) 142-154.
- H. Spielmann, I. Pohl, B. Doring, M. Liebsch, F. Moldenbauer. The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicol* 10 (1997) 119-127.
- D.A. van Dartel, J.L. Pennings, F.J. van Schooten, A.H. Piersma. Transcriptomics-based identification of developmental toxicants through their interference with cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 243 (2010) 420-428.
- D.A. van Dartel, A.H. Piersma. The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity. *Reprod Toxicol* 32 (2011) 235-244.
- R.J. Vandebriel, A. Opperhuizen. Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven. RIVM rapport 340720005. 2011. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/340720005.pdf>
- B. van der Burg, E.D. Kroese, A.H. Piersma. Towards a pragmatic alternative testing strategy for the detection of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 31 (2011) 558-561.
- K. van der Jagt, S. Munn, J. Tørsløv, J. de Bruijn. Alternative approaches can reduce the use of animals under REACH; 2004, <http://home.kpn.nl/reach/downloads/reducingtheuseoftestanimalsunderreachihcprepor.pdf>
- J.W. van der Laan, R.E. Chapin, B. Haenen, A.C. Jacobs, A. Piersma. Testing strategies for embryo-fetal toxicity of human pharmaceuticals. Animal models vs. in vitro approaches: a workshop report. *Regul Toxicol Pharmacol* 63 (2012) 115-123.
- H. van Loveren, A. Piersma. Immunotoxicological consequences of perinatal chemical exposures. *Toxicol Lett* 149 (2004) 141-145.
- S. Weight, N. Huebler, R. Strecker, T. Braunbeck, T.H. Broschard. Zebrafish embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281 (2011) 25-36.
- P.R. West, A.M. Weir, A.M. Smith, E.L. Donley, G.G. Cezar. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicol Appl Pharmacol* 247 (2010) 18-27.

L. Yang, N.Y. Ho, R. Alshut, J. Legradi, C. Weiss, M. Reischl, R. Mikut, U. Liebel, F. Muller, U. Strahle. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratologic effects of chemicals. *Reprod Toxicol* 28 (2009) 245–253.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl