



# 3V's in veiligheidstesten voor voortplantings- en ontwikkelingsbiologie

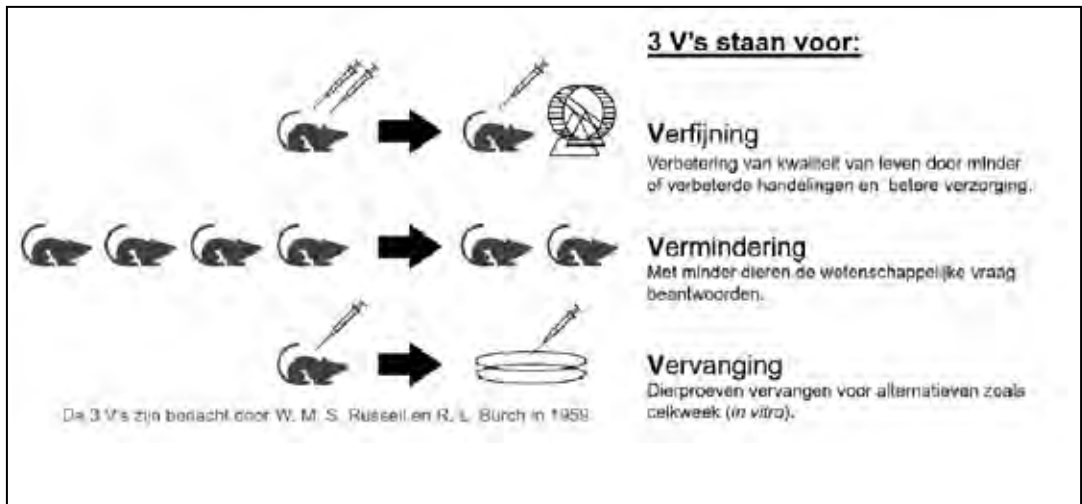
Manon Beekhuijzen

*Manon.Beekhuijzen@crl.com*

**Op 5 juli jl. promoveerde Manon Beekhuijzen op haar onderzoek naar de optimale invoering van de 3V principes (verfijning, vermindering en vervanging) in wettelijk vereiste veiligheidstesten in de voortplantings- en ontwikkelingsbiologie. Het proefschrift de beschrijft de praktische uitvoer, met het doel om collega's wereldwijd enthousiast te krijgen zodat zij deze verbeteringen ook gaan toepassen.**

Mensen, dieren en het milieu worden blootgesteld aan allerlei chemicaliën waarvan de grootste groep bestaat uit industriële chemicaliën (bijvoorbeeld schoonmaakmiddelen), landbouwchemicaliën en medicijnen. Om de veiligheid voor mensen, dieren en het milieu te waarborgen, worden deze chemicaliën getest op toxiciteit (giftigheid). Bij veel van deze testen worden proefdieren gebruikt. Er zijn verschillende testen die moeten worden uitgevoerd, afhankelijk van het soort stof en de verwachte blootstelling. Dit staat beschreven in wettelijke richtlijnen. De hoeveelheid van de stof die op de markt komt, bepaalt voor industriële chemicaliën welke testen er uitgevoerd moeten worden; hoe hoger het volume, hoe uitgebreider de testen zijn. Voor landbouwchemicaliën en medicijnen moet er altijd een vaste reeks testen worden uitgevoerd. Daarbij is de doelgroep van het medicijn bepalend voor de hoeveelheid testen die uitgevoerd moeten worden (bijvoorbeeld meer testen wanneer het medicijn voor kinderen is).

Alle drie de soorten chemicaliën moeten getest worden op 1) veiligheid bij de voortplanting (reproductie) en 2) effect op de ontwikkeling van de nakomelingen, behalve bij lage productie/importvolumes van industriële chemicaliën. Voor deze testen worden erg veel proefdieren gebruikt doordat er relatief veel dieren per groep nodig zijn om een effect op reproductie aan te tonen. Daarbij tellen alle nakomelingen in beide typen studies ook mee in de aantallen bij het proefdiergebruik. Hierdoor gebruiken dit type toxiciteitstesten de grootste aantallen >>



Afbeelding 1: De 3V's: verfijning, vermindering en vervanging van proefdieren.

proefdieren in het complete pakket voor veiligheidsbepalingen.

## Relevantie voor de mens

De laatste tijd wordt er meer getwijfeld aan de relevantie van deze dierstudies voor de mens. Mensen zijn immers geen ratten of konijnen. Er zijn verschillende voorbeelden van stoffen die ernstige effecten in de rat laat zien, die niet terug te zien zijn in de mens. Aspirine veroorzaakt bijvoorbeeld aangeboren afwijkingen in ratten, maar niet in mensen. In de huidige manier van testen wordt niet gekeken naar de manier waarop bepaalde effecten in proefdieren zijn ontstaan, waardoor je niet weet of het resultaat relevant is voor de mens. Veel winst zal dus te halen zijn in het beter kijken naar hoe bepaalde effecten ontstaan en of deze mechanismen hetzelfde zijn in de mens. Ook is er een groot verschil in de hoeveelheid blootstelling van de proefdieren ten opzichte van de mens. De embryonale ontwikkeling van een rat duurt 21 dagen en van een mens 9 maanden. Per dag zijn er dus veel meer ontwikkelingsprocessen bezig in de rat vergeleken met de mens. Hierdoor kan een dagelijkse hoge dosering op één moment een veel ernstiger effect hebben op de ontwikkeling van de rat dan op dat van de mens. Daarbij zijn de testen nog niet compleet en ontbraken tot voor kort metingen die erg belangrijk zijn voor de mens. Deze testen voor hormoonverstoringen, effecten op gedrags- en hersenontwikkeling en op ontwikkeling van het immuunsysteem, zijn recent toegevoegd.

## Doel van het onderzoek

Met het oog op de 3V's (verfijning, vermindering en vervanging van proefdieren; zie afb. 1), de grote aantallen proefdieren die gebruikt worden in toxiciteitstesten voor reproductie en ontwikkeling, en de onzekerheden in de relevantie van deze testen voor de mens, valt er veel winst te behalen door dit type studies te optimaliseren. Het doel van het onderzoek was om te evalueren of en waar het mogelijk is om de 3V's toe te passen in toxiciteitstesten voor voortplanting en ontwikkeling, zonder de integriteit en validiteit van de studieopzet te verliezen. De focus ligt op de praktische uitvoer, om zo collega's wereldwijd enthousiast te maken zodat zij deze verbeteringen ook gaan toepassen.

Het proefschrift bestaat uit drie delen:

- 1 Het eerste deel beschrijft de winst die te halen valt door verfijning van de methode voor >>

bloedafname. Hierdoor heeft het proefdier minder ongerief en kunnen er zelfs substantieel minder ratten worden ingezet.

2 Het tweede deel beschrijft het effect op verfijning en vermindering in recent aangepaste richtlijnstudies voor industriële chemicaliën.

3 Het derde deel beschrijft in hoeverre het mogelijk is om huidige testen voor ontwikkelingstoxicologie te vervangen door de zebravis-embryotoxiciteitstest.






## Deel 1: Verfijning van bloedafname

Voor medicijnen moet de verspreiding van de teststof in het bloed (de kinetiek) gemeten worden op zes tijdstippen binnen 24 uur. In het proefschrift wordt een verbeterde manier van bloedafname beschreven, namelijk capillaire microsampling (CMS). Door de invoer van CMS en een hierop aangepaste analyse methode (waarbij minder bloedmonster nodig is), kan het volume van deze bloedmonsters van 0.3 ml (volgens de oude methode) naar 0.03 ml per keer. Doordat de hoeveelheid bloed per keer tienmaal minder is dan voorheen en er geen anesthesie nodig is bij deze methode, is het ongerief nu substantieel minder.

We hebben uitgetest welke locatie van bloedafname mogelijk was om te gebruiken voor CMS bij rattenpups van 4, 10 en 17 dagen oud. De bloedafnamelocaties waren: submandibulair (wangprik), dijbeen, staart en hals. Bloedafname uit de dijbeenader was niet mogelijk voor alle geteste leeftijden omdat de ader niet zichtbaar was. Hetzelfde was het geval voor de jugularisvene van 4 en 10 dagen oude pups, en voor de staartvene van 4 dagen oude pups. Voor 10 dagen oude pups gaf de staart onvoldoende bloedvolume. Afb. 2 laat de details zien van de bloedafnames die uitgevoerd konden worden. Hieruit bleek dat de beste locatie voor 4 en 10 dagen oude pups de submandibulaire ader was, en voor 17 dagen oude pups de staartvene. Tevens liet dit zien dat 4 dagen oude pups tweemaal binnen 24 uur gesampled kunnen worden; dit was driemaal voor 10 en 17 dagen oude pups. Deze hoeveelheden zijn 10, 7 en 4% van het circulerend bloedvolume voor de pups van 4, 10 en 17 dagen, respectievelijk. Door deze methode in te voeren voor kinetiek bij studies met juveniele ratten, is het mogelijk om het aantal dieren dat bestemd is voor bloedafname (satellietdieren) te verminderen met 75%. Met de 'oude methode' waarbij 0,3 ml bloedmonsters verzameld worden, worden er twee pups van 4 dagen oud gebruikt om één monster te verzamelen. Hiervoor zijn 288 pups

Afbeelding 2. Overzicht van bloedafnamelocaties gebruikt voor microsampling van 4, 10 en 17 dagen oude pups (als poster gepresenteerd bij het SOT congres in 2015).

Four microsampling methods (lateral tail vein (TV), saphenous vein (SapV), submandibular vein (SubV), jugular vein (JV)) were tested on PND4, 10 and 17 pups according to guidelines for survival bleeding of rats. The selected blood microsampling method for pups at different ages and associated results are summarized below:

	PND4	PND10	PND17		
Method	Submandibular Vein	Submandibular Vein	Submandibular Vein	Tail Vein	Jugular vein
Pre-sunning	No	No	No	29°C warming box 8 min	No
Shaving	No	No	No	No	Yes
Restrain	Hand restrain	Hand restrain	Hand restrain	Tube restrain	Hand restrain
Needle size	25G needle punch	21G needle punch	21G needle punch	25G butterfly needle insert	21G needle insert
Hemostasis	Hemostatic Gelatin sponge	Hemostatic Gelatin sponge	Finger/tissue compression	Finger/tissue compression	Finger/tissue compression
Frequency	3 x 32µl*	3 x 32µl*	3 x 32µl*	3 x 32µl	3 x 32µl
Time consumed	1-1.5 min/sample / 2 technicians	1-1.5 min/sample / 2 technicians	1-1.5 min/sample / 2 technicians	1-3 min/sample / 1 technician	1-1.5 min/sample / 2 technicians
Photo					

\*Repeated sampling (3 x 32µl) is possible by alternating the side of cheek

nodig. Met CMS is het mogelijk om van één pup twee monsters af te nemen. Hiervoor zijn 72 pups nodig. Dit is een besparing van 216 pups per studie.

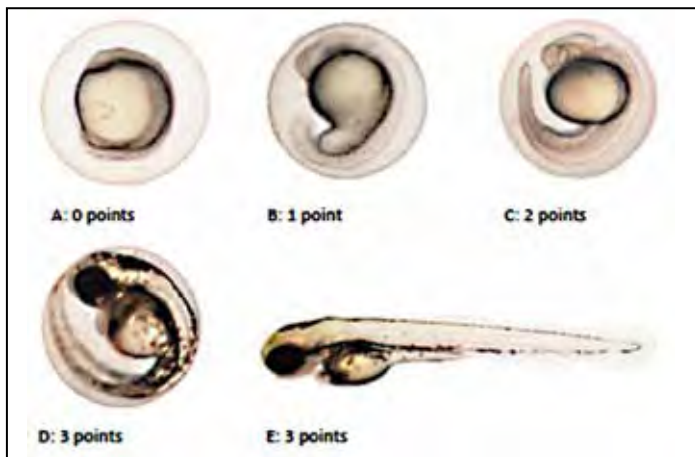
In de gevallen wanneer CMS niet gebruikt kan worden (vanwege de analytische methode), kan bloedafname via de jugularisvene ervoor zorgen dat er geen satellietdieren nodig zijn in ontwikkelingstoxiciteitstesten in de rat. Dit geeft een proefdier vermindering van 20%. En voor de dieren die wel gebruikt worden voor bloedafname, een vermindering in ongerief omdat bloedafname uit de jugularisvene erg weinig ongerief geeft ten opzichte van de conventionele technieken die soms zelfs gebruik maken van anesthesie.

## Deel 2: Effectiviteit van reproductie/ontwikkeling-screening studies

Het tweede deel van het proefschrift gaat onder andere over de effectiviteit van reproductie/ontwikkeling-screening studies (volgens OECD 421 en 422 richtlijnen uit 1995 en 1996). Deze studies moeten uitgevoerd worden voor industriële chemicaliën om een indicatie te geven over mogelijke effecten op de voortplanting en ontwikkeling. Hierbij worden ratten (tien ratten per geslacht per groep) gedurende de volgende periode gedoseerd met de teststof: een aantal weken voordat ze gepaard worden, gedurende de paringsperiode, tijdens de dracht en tijdens lactatie. Zo'n studie bestaat uit één controle groep en drie teststofgroepen. Er wordt dan gekeken of de teststof een effect veroorzaakt op bijvoorbeeld het aantal dieren dat gedekt wordt, het aantal dieren dat drachtig is, de grootte van de nesten, en de overleving van de pups.

Uit onze retrospectieve analyse van 134 studies bleek dat dit soort studies erg waardevol zijn doordat ze unieke data genereren met een relatief laag aantal proefdieren, maar dat een paar simpele toevoegingen (bijvoorbeeld bepalingen voor hormoonverstoringen, zoals het meten van de anogenitale afstand bij de pups) de risicobeoordeling verder kan verbeteren. Een aantal van deze toevoegingen zijn doorgevoerd als verbetering van de OECD 421 en 422 richtlijnen in 2015. Het proefschrift geeft praktische details over de uitvoering van deze extra metingen, om ervaringen te delen zodat andere laboratoria, studiemonitoren en registratieautoriteiten hiervan gebruik kunnen maken. Het vermeldt ook een aantal kritische punten met betrekking tot deze richtlijnaanpassing en het effect op de 3V's. Een voorbeeld hiervan is dat de richtlijn nu omschrijft dat er per test acht extra vrouwelijke ratten ingezet moeten worden om ervoor te zorgen dat er alleen dieren met een regelmatige oestruscyclus in de studie starten. Volgens onze evaluatie weegt de toegevoegde waarde hiervan voor de uiteindelijke evaluatie van de studieresultaten niet op tegen het gebruik van meer proefdieren.

Tevens beschrijven we onze ervaring met de invoering van OECD 443, de uitgebreide één-generatie studie. Wanneer er een erg grote hoeveelheid van een bepaald industrieel chemicaal op de markt is, is het nodig om deze test uit te voeren. De studie lijkt erg op de hierboven omschreven reproductie-screening studies, maar deze studie duurt langer en gebruikt meer dieren (24 ratten per geslacht per groep voor de ouderdieren). Deze richtlijnstudie is ingevoerd ter vervanging van een twee-generatie studie, en gebruikt daardoor nog maar 60% van het oorspronkelijke aantal dieren. Het belangrijkste kenmerk van dit type test is dat geselecteerde nakomelingen verdeeld worden over verschillende cohorten, maar dat er niet één standaard studieopzet is. Per teststof wordt er bekeken welke informatie al beschikbaar is, en hierop wordt dan de studieopzet aangepast. Deze cohorten worden gebruikt om mogelijke effecten te onderzoeken op 1) ontwikkeling, integriteit en functie van de geslachtsorganen, 2) de hersenontwikkeling en gedrag en 3) de functie van het immuunsysteem. Deze test zorgt in meerdere opzichten voor verfijning en verminderen van het aantal proefdieren, doordat de tweede generatie niet meer nodig is en er alleen extra metingen worden >>



Afbeelding 3: Het scoren van ontwikkeling van de staart van de zebrafish-embryo, waarbij A) en B) normaal gesproken 4 uur na bevruchting zichtbaar zijn, C) na 24 uur, D) na 48 uur en E) na 72 uur.

toegevoegd wanneer deze nodig zijn. Bovendien, omdat je de extra metingen toevoegt in de studie, zijn extra testen hierop in aparte studies niet meer nodig.

### Deel 3: de embryotoxiciteitstest in zebrafissen

Om uit te zoeken of een stof mogelijk aangeboren afwijkingen kan veroorzaken, worden er ontwikkelingstesten uitgevoerd in ratten en konijnen. Als alternatief hierop is de embryotoxiciteitstest in zebrafissen in ontwikkeling. De zebrafish-embryo wordt gezien als alternatief omdat het embryo (in de periode van testen) nog niet zelfstandig kan leven. Op dit moment gebruiken de verschillende laboratoria die hieraan werken, allemaal verschillende manieren om deze test uit te voeren. Om deze alternatieve test te kunnen gebruiken als vervanging van ratten- en konijnenstudies, moet er eerst een wettelijke richtlijn voor ontwikkeld worden. Om harmonisatie van de testmethodes wereldwijd te stimuleren (zodat iedereen dezelfde studie- opzet gaat gebruiken en er uiteindelijk een wettelijke richtlijn gemaakt kan worden), hebben wij de meest optimale studieopzet bepaald. Deze is gebaseerd op artikelen en experimenteel bewijs over 1) temperatuur, 2) testkamer, 3) blootstellingsperiode, 4) aanwezigheid van het chorion (=membraan om het ei), 5) gebruik van oplosmiddelen, 6) blootstellingsmethode, 7) concentraties en 8) teratogene classificatie (=classificatie voor ernstige aangeboren afwijking). Voor al deze parameters omschrijven wij wat de juiste aanpak zou zijn. Een heel belangrijke meting is de score van het uiterlijk van de zebrafish (ontwikkelt deze zich normaal of zijn er afwijkingen). De manier waarop wij deze score bepalen, hebben wij ook beschreven om een wereldwijde harmonisatie nog verder te helpen (zie afb. 3 voor een voorbeeld hiervan). Tevens hebben we onderzocht dat het enorm belangrijk is om de interne blootstelling (in het embryo) aan de teststof te meten. Sommige stoffen worden door de chemische eigenschappen (bijvoorbeeld bij een lage vetoplosbaarheid) amper opgenomen door de zebrafish-embryo. Hierdoor krijgt het embryo geen teststof binnen en zal het lijken alsof de stof veilig is.

### Conclusie

In het algemeen zijn recent toegepaste verbeteringen in wettelijk vereisten veiligheidstesten in de voortplantings- en ontwikkelingsbiologie gefocust op het verminderen van proefdieren en op verfijning. Dit is een enorme verbetering en is zeker iets wat we moeten blijven doen. Daarnaast zullen nieuwe wetenschappelijke en technische ontwikkelingen zorgen voor mogelijkheden om proefdieren te vervangen (bijvoorbeeld met computermodellen en menselijke cellen). Hierdoor zal in de toekomst het aantal proefdieren zo verminderd worden, dat uiteindelijk de gevaar- en risicoschatting van stoffen volledig zonder proefdieren uitgevoerd kan worden. Dit is natuurlijk niet zo simpel omdat er nog erg veel onderzoek voor nodig is en er nog veel onzekerheden zijn. Maar vooral in Nederland zijn er erg veel goede initiatieven gaande. Mijn oproep is om deze initiatieven (van universiteiten, autoriteiten en industrie) zoveel mogelijk samen te voegen zodat we elkaar verder kunnen helpen en zo ons gezamenlijk doel eerder kunnen realiseren.

«