

Inventaris Wob-verzoek W22-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20198486	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	aanvraag projectvergunning, d.d. 19 juli 2019				x		x		x	
2	projectvoorstel (1)				x	x			x	
3	bijlage dierproeven 1 (1)				x				x	
4	bijlage dierproeven 2 (1)				x				x	
5	NTS (1)			x						
6	e-mail van CCD aan DEC met adviesverzoek, d.d. 24 juli 2019				x		x		x	
7	e-mail van CCD aan VGH met ontvangstbevestiging, d.d. 24 juli 2019				x		x		x	
8	Ontvangstbevestiging, d.d. 24 juli 2019				x		x		x	
9	e-mail andere aanvraag, d.d. 10 september 2019				x		x		x	
10	e-mail andere aanvraag, d.d. 11 september 2019				x		x		x	
11	e-mail van DEC aan CCD over complexiteit aanvraag, d.d. 11 september 2019				x		x		x	
12	e-mail van DEC aan CCD over doorlooptijd, d.d. 14 september 2019				x		x		x	
13	e-mail van CCD aan DEC over complexiteit aanvraag, d.d. 16 september 2019				x		x		x	
14	e-mail van DEC aan CCD bij advies, d.d. 18 september 2019				x		x		x	
15	e-mail van CCD aan DEC met ontvangst stukken, d.d. 18 september 2019				x		x		x	
16	e-mail van DEC aan CCD over stukken, d.d. 19 september 2019				x		x		x	
17	e-mail van CCD aan DEC over stukken, d.d. 19 september 2019				x		x		x	
18	e-mail van DEC aan CCD over stukken, d.d. 19 september 2019				x		x		x	
19	e-mail van CCD aan DEC over stukken, d.d. 19 september 2019				x		x		x	
20	e-mail van DEC aan CCD over stukken, d.d. 19 september 2019				x		x		x	

21	e-mail van CCD aan DEC over stukken, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
22	e-mail van DEC aan CCD over stukken, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
23	e-mail van CCD aan DEC over stukken, d.d. 20 september 2019				x		x		x	
24	DEC-advies met bijlagen				x	x	x		x	
25	projectvoorstel (2)				x	x			x	
26	bijlage dierproeven 1 (2)				x				x	
27	bijlage dierproeven 2 (2)				x				x	
28	NTS (2)				x	x				
29	e-mail van VGH aan CCD over periode projectvergunning, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
30	e-mail van CCD aan VGH aanvullende vragen, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
31	opschortbrief aan VGH, d.d. 20 september 2019				x		x		x	
32	conceptadviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
33	adviesnota aan CCD, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
34	e-mail van VGH aan CCD met antwoord op vragen, d.d. 26 september 2019				x	x	x		x	
35	e-mail van CCD aan VGH over NTS, d.d. 30 september 2019				x		x		x	
36	e-mail van VGH aan CCD over NTS, d.d. 30 september 2019				x		x		x	
37	e-mail van VGH aan CCD over NTS, d.d. 30 september 2019				x		x		x	
38	beschikking, d.d. 3 oktober 2019				x		x		x	
39	NTS gepubliceerd	x								
40	terugkoppeling aan DEC, d.d. 25 oktober 2019				x		x		x	

8486



25 JULI 2019

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- Ja > Vul uw deelnemernummer in **5.1 lid2h**
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie **5.1 lid2h**
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde **5.1 lid2e**
KvK-nummer **5.1 lid2h**
Straat en huisnummer **5.1 lid2h**
Postbus **5.1 lid2h**
Postcode en plaats **5.1 lid2h**
IBAN **5.1 lid2h**
Tenaamstelling van het rekeningnummer **5.1 lid2h**
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters **5.1 lid2e** Dhr. Mw.
Functie **5.1 lid2e**
Afdeling **Toxicologie**
Telefoonnummer **5.1 lid2h**
E-mailadres **5.1 lid2e**
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters **5.1 lid2e** Dhr. Mw.
Functie **5.1 lid2e**
Afdeling **Toxicologie**
Telefoonnummer **5.1 lid2h**
E-mailadres **5.1 lid2e**

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
E-mailadres

Dhr. Mw.

1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
 Nee

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
 Nee > Ga verder met vraag 3

2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 27 - 9 - 2019
Einddatum 31 - 12 - 2019

3.2 Wat is de titel van het project?

Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek naar de lever-gemedieerde thyroid toxiciteit na prenatale blootstelling in de rat.

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC
Postadres
E-mailadres

5.1 lid2h

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.885 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

19 - 7 - 2019

Handtekening

5.1 lid2e



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Motivation

Thyroid hormone level changes may cause adverse effects, not only in the thyroid but also in other tissues. The exposure to e.g. xenobiotics can induce hepatic metabolism causing elevation of phase I and phase II enzymes, which in turn may cause enhanced clearance of thyroid hormones (Barter & Klaassen, 1992; Liu et al., 1995; Shelby & Klaassen 2006; Viollo-Abadie et al., 2000), and thereby disturbing the thyroid hormone balance. Although the relation between thyroid hormones and hepatic metabolism has been studied extensively in adult rats, the consequences of such changes in pregnant rats for embryo-fetal and postnatal development have not been studied in that much detail. This is, however, of high relevance given the role of thyroid hormones in prenatal development, especially with regard to brain development.

Moreover, the role and understanding of thyroid hormones in pre- and postnatal development became of more importance, as the OECD guideline studies on developmental and reproductive toxicology (OECD TG 421, 422 and more recently OECD414) were updated with thyroid measurements. In the absence of concomitantly observed adverse health effects, the interpretation of physiological and hormonal changes in relation to endocrine disruption is a highly relevant subject in regulatory toxicology. The significant differences of viewpoints within the scientific and regulatory communities result in controversy on how to define endocrine disrupters and indicates that a fundamental understanding of relevant adverse outcome pathways is needed.

To develop an adverse outcome pathway (AOP) for the effect of increased maternal TH metabolism on fetal and neonatal brain development, quantitative relationships have to be determined between the molecular initiating event (MIE), the subsequent key events (KE), and the ultimate adverse outcome, and will be the aim of this multi-stakeholder project.

Background

Thyroid hormones are critical for development of the fetal and neonatal brain, as well as for many other aspects of pregnancy and fetal growth. There is increasing evidence from epidemiological studies and patient reports that these hormones are already needed for orderly development during the first trimester, when the fetus is entirely dependent on the maternal transfer of thyroxine. Thyroxine (T4) is a prohormone and has to be converted intracellularly into the active hormone 3,5,3'-triiodothyronine (T3), which exerts its action via binding to the nuclear thyroid hormone receptors. A decrease in maternal circulating thyroxine during the first trimester may well result in irreversible mental and psychomotor impairments (Morreale, 2001).

Thyroid hormone homeostasis is controlled by a complex interplay of checks and balances in the hypothalamic-pituitary- thyroid axis (**Figure 1**). Hypothalamic Thyroid Releasing Hormone (TRH) stimulates pituitary Thyroid Stimulating Hormone (TSH) release from the pituitary, which in turn stimulates Thyroid Hormone (TH) production by the thyroid. Negative feedback loops run from thyroid hormone levels in the blood to pituitary and hypothalamus to provide homeostasis. TH is transported in the blood via binding to binding proteins like TBG. Once taken up in the cell, TH can be metabolized by different routes. The main routes are deiodination by sulfation, glucuronidation and deiodinating enzymes. The interplay between different TH activating and inactivating pathways determines the intracellular concentration of active T3 in the cell and thus cellular and tissue function.

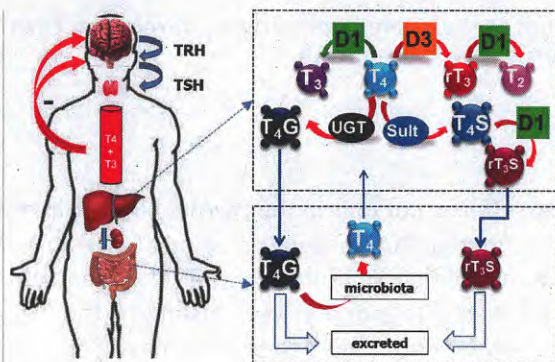


Figure 1. Thyroid hormone homeostasis and metabolism

One of the metabolic pathways by which chemicals may cause effects on thyroid hormone homeostasis is induction of hepatic glucuronidation of T3 and T4 by glucuronyl transferase (UGT) enzymes. The active T3 becomes inactive when a glucuronic acid is transferred to its hydroxyl group and T4 can no longer be converted into active T3 after glucuronidation. Moreover, glucuronidated iodothyronines are excreted into the bile and excreted through feces. As a consequence, T3 and T4 plasma levels may decrease resulting in hypothyroidism. Similarly, chemicals may cause increased sulfotransferase (SULT) activity in the liver, leading to increased hepatic TH sulfation and decreased levels of TH in plasma.

Increased biliary elimination of thyroid hormone is not only caused by increased hepatic activity of conjugating enzymes. Alternatively, increased biliary elimination may be due to induced transport of thyroid hormone into the liver. In particular activation of nuclear receptors CAR and PXR, which are also responsible for increased TH-UGT activity, may cause increased expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) and monocarboxylate transporters (MCTs) (Miller et al. 2009).

Finally, previous studies have indicated that enzyme inducers, such as xenobiotics, can affect activity of deiodinase enzymes in liver and other tissues (Hood and Klaassen, 1999). Deiodinase enzymes are capable of removing an iodine atom from the inner or outer ring of a TH isoform. Outer ring deiodination of T4 by type 1 and type 2 deiodinase results in the activation of the hormone by generation of T3. Inner ring deiodination of T4 by type 3 deiodinase results in the formation of the inactive metabolite reverse T3 (rT3) (Figure 1). T3 can also be inactivated by inner ring deiodination resulting in the formation of 3,3'-diiodothyronine (3,3'-T2), a metabolite that can also be produced by outer ring deiodination of rT3 (Figure 1). Deiodinases are differentially expressed between various cell and tissue types.

References:

- Barter RA, Klaassen CD. Rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine: characterization, induction, and form specificity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992 Aug;115(2):261-7
- Kamstra, J H, Du, T, Visser, T J, Van der Ven, L T M, Murk, A J, Hamers, T, 2007. In vitro induction of organic anion transporting polypeptides (OATPs) as a possible mechanism for thyroid hormone disruption by hexabromocyclododecane (HBCD). *The fourth international workshop on brominated flame retardants, BFR2007, Amsterdam, The Netherlands*
- Hood A, Liu J, Klaassen CD. Effects of phenobarbital, pregnenolone-16 α -carbonitrile, and propylthiouracil on thyroid follicular cell proliferation. *Toxicol Sci* 1999;50:45-53
- Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD. Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study. *J Pharmacol Exp Ther* 1995 May;273(2):977-85
- Miller, M D, Crofton, K M, Rice, D C, Zoeller, R T, 2009. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environmental Health Perspectives* 117: 1033-1041
- Morreale de Escobar G. The role of thyroid hormone in fetal neurodevelopment. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 Suppl 6:1453-62

Shelby MK, Klaassen CD Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways *Drug Metab Dispos* 2006 Oct;34(10):1772-8 Epub 2006 Jul 19

Viollon-Abadie C, Bigot-Lasserre D, Nicod L, Carmichael N, Richert L Effects of model inducers on thyroxine UDP-glucuronosyl-transferase activity in vitro in rat and mouse hepatocyte cultures *Toxicol In Vitro* 2000 Dec;14(6):505-12

Visser W E , Friesema E C H , Visser, T J , 2010 Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns *Molecular Endocrinology* 25: 1-14

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

General aim

This project aims at monitoring relevant maternal and offspring liver and thyroid parameters after prenatal exposure to the liver enzyme inducer pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) using Benchmark Dose (BMD) modelling in order to define quantitative relationships between the first three key events in the Adverse Outcome Pathway (AOP). Moreover, an extensive collection of tissues from the study will be stored for analysis, providing the opportunity for relating in-life results to adverse outcome parameters.

Objectives of Proposed Research

- Characterize maternal, foetal and pup thyroid and thyroid related parameters after prenatal exposure (GD 6-20) to PCN in a dose response manner applying BMD analysis in all relevant tissues (e.g. blood, brain, liver, thyroid) in the rat at defined time points.
- Determine relative sensitivity of the liver and thyroid related parameters after model compound exposure based on BMD analysis.
- Investigate the quantitative relationships between liver and thyroid parameter responses after exposure to PCN during gestation.
- Quantify the first three Key Event Relationships (KER) of the AOPs related to liver-mediated thyroid modulation to determine point of departures for each Molecular Initiating Events (MIE)/Key Event (KE) based on the data generated in the project.
- Collection of tissues and organs for future analyses of AOP-related adverse health effect parameters.

Achievability

A literature review was performed by the project group to select the model compound, the dose levels and administration route for the in vivo study. The model compound should specifically cause thyroid modulation (T4 clearance and TSH induction) through phase II metabolism in the liver. As such, in order to test the effects of thyroid hormonal disturbance on the fetus, the model compound should be a strong inducer of phase II liver enzymes (in adult rats), followed by secondary modulation of the thyroid axis (Liu et al., 1995). The selected model compound, pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) will have the advantage of being a steroid, which is highly relevant in view of the endocrine disruption issue underlying this project. Moreover, it apparently does not directly interact with the developing brain and the thyroid system, which allows uncompromised assessment of the liver-thyroid AOP that is central to this project.

The present study will be performed at **5.1 lid1c, 5.1 lid2h** At **5.1 lid1c** OECD guideline studies on developmental and reproductive toxicology are performed on a regular basis. Since the update of OECD TG 421 and 422 with thyroid hormone measurements, the **5.1 lid2h** site has performed > 100 OECD 421/422 studies. Ample historical control data and extensive experience is therefore available.

Materials collected during the present study, i.e. blood and tissues, will be processed for various assessments by different experts and laboratories within the consortium of this project. Thyroid parameters will be assessed at the 5.1 lid1c where extensive experience exists with thyroid physiology and pathology, and where standardized assays for quantitation of these parameters in rodents and man are routinely performed (Ackermans, 2012; van Beeren et al, 2012; de Vries et al., 2014,2015; Boelen et al, 2017). Glucuronidation and sulfation assays will be carried out at the 5.1 lid1c using methods optimized by Schuur et al. (1997; 1999). The 5.1 lid1c has a history with this group and has adopted these assays, e.g. the same technician will perform the measurements proposed in this study. At 5.1 lid1c, earlier glucuronidation assays with liver microsomes have been performed in the FIRE project (Van der Ven et al. 2006). Data will be analyzed at 5.1 lid1c using the benchmark dose (BMD) approach, in order to provide input for generating a (quantitative) AOP. The development and application of adverse outcome pathways (AOP) in developmental toxicology is the subject of recent and ongoing studies at 5.1 lid1c (Hessel et al., 2018).

References:

- Ackermans MT, Kettelarij-Haas Y, Boelen A, Endert E Determination of thyroid hormones and their metabolites in tissue using SPE UPLC-tandem MS 2012 Biomed Chromatogr 26(4):485-90
- Boelen A, van der Spek AH, Bloise FF, de Vries EM, Surovtseva OV, van Beeren HC, Ackermans MT, Kwakkel J, Fliers E Tissue thyroid hormone metabolism is differentially regulated during illness in mice J Endocrinol 2017 Jan 27 doi: 10.1530/endo-17-0001
- de Vries EM, Eggels L, van Beeren HC, Ackermans MT, Kalsbeek A, Fliers E, Boelen A Fasting induced changes in hepatic thyroid hormone metabolism in male rats are independent of autonomic nervous input to the liver Endocrinology 2014 155(12):5033-41
- de Vries EM, van Beeren HC, Ackermans MT, Kalsbeek A, Fliers E, Boelen A Differential effects of fasting versus food restriction on liver thyroid hormone metabolism in rats J Endocrinol 2015 224(1):25-35
- Hessel EVS, Staal YCM, Piersma AH Design and validation of an ontology-driven animal-free testing strategy for developmental neurotoxicity testing Toxicol Appl Pharmacol 2018 Sep 1;354:136-152
- Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study J Pharmacol Exp Ther 1995 May;273(2):977-85
- Schuur A G , Boekhorst F M , Brouwer A & Visser T J , 1997 Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats Endocrinology 138: 3727-3734
- Schuur A G , Bergman A , Brouwer A , Visser T J 1999 Effects of pentachlorophenol and hydroxylated polychlorinated biphenyls on thyroid hormone conjugation in a rat and a human hepatoma cell line Toxicology in Vitro 13: 417-425
- Van Beeren HC, Kwakkel J, Ackermans M, Wiersinga WM, Fliers E, Boelen A Action of specific thyroid hormone receptor $\alpha 1$ and $\beta 1$ antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat Thyroid 2012 22(12):1275-82
- Van der Ven LTM, Verhoef A, Van de Kuil T, Slob W, Leonards PEG, Visser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H, Piersma AH, Vos JG, 2006 A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in Wistar rats Toxicological Sciences 94: 281-292

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Thyroid hormones are critical for development of the fetal and neonatal brain, as well as for many other aspects of pregnancy and fetal growth. There is increasing evidence from epidemiological studies and patient reports that these hormones are already needed for orderly development during the first trimester, when the fetus is entirely dependent on the maternal transfer of thyroxine, the main precursor for intracellular generation of the more active 3,5,3'-triiodothyronine for binding to the nuclear hormone receptors. A decrease in maternal circulating thyroxine during the first trimester, whether or not

accompanied by increased circulating thyroid-stimulating hormone, may well result in irreversible mental and psychomotor impairments (Morreale, 2001).

The interpretation of physiological and hormonal changes in animal studies in relation to endocrine disruption, especially in the absence of concomitantly observed adverse health effects, is a highly relevant subject in regulatory toxicology. There are significant differences of viewpoints within the scientific and regulatory communities on how to translate such animal findings to human risk. Given the ongoing controversy on how to define endocrine disruptors it is imperative that a fundamental quantitative understanding of relevant adverse outcome pathways is needed. This project will lay the groundwork for quantitatively defining the molecular interactions and responses in the liver-thyroid area after prenatal exposure, providing the basis for relating molecular and physiological changes to adverse outcome in the rat, followed by extrapolation to the human in possible future projects.

References:

Morreale de Escobar G. *The role of thyroid hormone in fetal neurodevelopment* *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 Suppl 6:1453-62

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

The research strategy of the proposed project aims to address the objectives formulated earlier: Monitoring relevant maternal and offspring liver and thyroid parameters after prenatal exposure to the liver enzyme inducer pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) using BMD modelling in order to define quantitative relationships between the first three key events in the AOP. Moreover, an extensive collection of tissues from the study will be stored for analysis, providing the opportunity for relating in-life results to adverse outcome parameters.

Setup

The study will consist of 9 groups: one vehicle control and 8 dose levels. The groups will consist of time-mated female rats (Wistar Han). The number of groups and number of animals per group will be determined based on the benchmark dose (BMD) approach. The BMD approach allows detailed dose-response assessment, comparison of relative sensitivities of different parameters and determination of point of departure. Advantages over the classical NOAEL/LOAEL approach include the use of all data for dose-response analysis, the independence of the BMD of selected doses used in the study design, and the possibility of deriving confidence intervals for the BMD. Such analysis forms the basis for the design of (quantitative) adverse outcome pathways. Parameters that are more sensitive tend to precede less sensitive parameters in the AOP. Our expertise with this methodology goes back more than two decades (Piersma et al., 2000; Slob et al., 2005; Tonk et al., 2010; Hessel et al., 2015) and has included developmental toxicity studies. The BMD approach is most beneficial when built upon a study design with enhanced dose group numbers, without the need for increasing the number of animals in the entire study. The present study design is tailored to this approach.

Treatment

Treatment with PCN will be once daily by oral gavage on Days 6-20 post-coitum. This period will cover the stage of in utero brain development that is sensitive to maternal thyroid hormone level changes. The groups will be evenly divided in two parts (Part A and B). In Part A, the maternal and fetal effects of PCN will be investigated and in Part B we will investigate the maternal and pup effects of the PCN (see also 3.4.2).

Dose level selection

Dose levels and therefore their spacing between dose levels will be selected in such manner that the entire dose-response spectrum of all parameters for efficient dose-response modelling and BMD derivation is covered. We anticipate that differences in sensitivity among the various parameters assessed in this study may be subtle, whereas such differences are essential for describing a quantitative AOP and for kinetic modelling. It is difficult to anticipate specifics in this complex situation. Therefore, the study was designed to optimize dose group sizes, number of dose groups, and number of animals per dose group, based on our existing expertise with pragmatic study designs optimized for benchmark modelling. In brief, the higher the number of dose groups, the better the dose-response estimation, but the more complex and error-prone the practicality of the study. On the other hand, the higher the number of dose groups, the lower the number of animals per group, which does not formally affect BMD modelling, but is less informative about within dose-group variation.

The highest dose level of PCN was selected based on literature research into the effects of PCN on thyroid metabolism. However, as currently experience on the tolerability of PCN in the rat at higher dose levels is not available from literature, a Dose Range Finder Study in non-pregnant rats is anticipated to test if the highest dose level selected for the Main Study is tolerated by the rats.

For each individual study, the design and experimental work plan will be documented in a study plan. These study plans will be authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB).

References:

- Hessel EV, Tonk EC, Bos PM, van Loveren H, Piersma AH *Developmental immunotoxicity of chemicals in rodents and its possible regulatory impact* *Crit Rev Toxicol* 2015 Jan;45(1):68-82
- Piersma AH, Verhoef A, te Biesebeek JD, Pieters MN, Slob W *Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design* *Reprod Toxicol* 2000 Sep-Oct;14(5):417-25
- Slob W, Moerbeek M, Rauniomaa E, Piersma AH *A statistical evaluation of toxicity study designs for the estimation of the benchmark dose in continuous endpoints* *Toxicol Sci* 2005 Mar;84(1):167-85 Epub 2004 Oct 13
- Tonk EC, de Groot DM, Penninks AH, Waalkens-Berendsen ID, Wolterbeek AP, Slob W, Piersma AH, van Loveren H *Developmental immunotoxicity of methylmercury: the relative sensitivity of developmental and immune parameters* *Toxicol Sci* 2010 Oct;117(2):325-35 doi: 10.1093/toxsci/kfq223 Epub 2010 Jul 21

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

A Dose Range Finder Study in non-pregnant rats is anticipated to test if the highest dose level selected for the Main Study (based on literature research into the effects of the model compound on thyroid metabolism) will be tolerated by the rats, as currently experience on the tolerability of PCN in the rat at higher dose levels is not available from literature.

For the Main Study, treatment will be once daily by oral gavage on Days 6-20 post-coitum. This period will cover the stage of in utero brain development that is sensitive to maternal thyroid hormone level changes. The groups will be evenly divided in two parts (**Part A and B**). Both parts will consist of a control group and eight treatment groups. In Part A we will investigate the maternal and fetal effects of PCN; in Part B we will investigate the maternal and pup effects of PCN.

Part A

For Part A, necropsy of the dams will be performed on Day 21 post-coitum. The following investigations will be performed in Part A, but are not limited to:

- Mortality check, clinical observations, and body weight and food consumption measurements at regular intervals.
- Blood sampling at the end of the post-coitum period to determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN.
- Blood sampling during post-coitum for determination of maternal rT3, total T3, total T4 and TSH concentrations.
- Blood sampling on Day 21 post-coitum from the fetuses and pooled per litter to determine at least total T4 concentrations. If sufficient blood will be collected, rT3, total T3 concentrations and/or TSH will be determined as well.
- Collection and weight of the liver and thyroid from all dams.
- Collection of the liver, thyroid and brain from all fetuses.

The remaining blood and tissues will be kept for possible future additional measurements.

Part B

For Part B, litters will be culled to a size of 8 pups/litter on postnatal day (PND) 4. Necropsy of the dams and remaining pups will be performed on PND 21. The following investigations will be performed during Part B, but are not limited to:

- Mortality check, clinical observations, and body weight and food consumption measurements at regular intervals.
- Blood sampling at the end of the post-coitum period to determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN.
- Blood sampling on PND 21 from all dams for determination of rT3, total T3, total T4 and TSH concentrations.
- Blood sampling on PND 4 from the culled pups and pooled per litter to determine at least total T4 concentrations. If sufficient blood will be collected, rT3, total T3 concentrations and/or TSH will be determined as well.
- Blood sampling on PND 21 from the pups and pooled per litter to determine levels of rT3, total T3, total T4 and TSH.
- Collection and weighing of the liver and thyroid from all dams.
- Collection of the liver, thyroid and brain from all culled pups on PND 4.
- Collection of the liver, thyroid and brain from all pups on PND 21.

The remaining blood and tissues will be kept for possible future additional measurements.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

This study assesses the liver-mediated thyroid toxicity after prenatal exposure of PCN in the rat. First, a pilot (Dose Range Finder) study with PCN will be performed in non-pregnant rats, to confirm that the model compound is tolerated at the highest dose level selected based on literature data. This will allow us to set the dose level of the high dose group, as currently experience with PCN in the rat at higher dose levels is not available from literature. Once the high dose level is selected, the dose levels for the other groups will be determined based on the BDM approach (also see 3.4.1) and the main *in vivo* study can be performed (Part A and Part B).

Overall, these experiments will provide more information on the sensitivity of the liver and thyroid related parameters after PCN exposure based on BMD analysis and quantify the first three KER of the AOPs related to liver-mediated thyroid modulation to determine point of departures for each MIE/KE based on the data generated in the project. Moreover, next to the evaluation of many relevant parameter within the current study (also see the detailed description of the Main Study in Appendix 1.3), tissues and organs will be collected for future analyses of AOP-related adverse health effect parameters.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Dose Range Finder Study
2	Main Study (Part A + B)
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Dose Range Finder Study

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The study procedures are performed to monitor the tolerance of pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) in rats at higher dose levels in order to establish the highest dose level for the main study, as currently this experience is not available from literature.

The study consists of an acclimation phase and treatment phase. During acclimation phase, animals will be habituated to their environment, which promotes both animal welfare and reproducible experimental results. In the treatment phase, PCN is administered by oral gavage, followed by specific observation of the animals to evaluate relevant parameters.

The animals will be treated once daily by oral gavage for a minimum of 10 days (and a maximum of 15 days).

The following investigations will be performed during the Dose Range Finder study:

- Twice daily mortality check
- Daily clinical observations
- Body weight measurements at regular intervals
- Food consumption measurements at regular intervals
- Macroscopy

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

- *Administration:* to achieve the study objectives animals may receive vehicle or PCN in the study period.

The model compound will be administered by oral gavage. The administration of vehicle or PCN will be applied such that the severity will no more be than transient mild, and that no lasting harm occurs. Animals will be repeatedly dosed, once daily for a minimum of 10 consecutive days, to obtain sufficient data regarding the possible toxicity of the model compound. Dose volume will be based on the most recent body weight measurement.

- *Body weight:* body weight will be determined at regular intervals to assess the health condition of the animal. Frequency may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Confinement and restraint:* one or more of the following methods may be used: manual restraint, short term separation (e.g. for observation purposes or blood collection).
- *Clinical observation:* clinical signs will be determined at least once daily to assess the health condition of the animal. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.

The above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs), which contain best practice procedures and are at least reviewed by Animal Welfare Body and Study Director. Compliance to these present SOPs will be monitored by Quality Assurance Officers, management, the Study Director and the Animal Welfare Body.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Studies are designed to obtain maximal information from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in a full study is considered the minimum needed to satisfy evaluation criteria.

The aim of the Dose Range Finder Study is to determine whether rats tolerate the highest dose level selected (based on available literature) for the Main Study. For this purpose, no statistical analysis will be performed on the data obtained from the study. Based on our extended experience with this type of range finder study, 3 animals/dose group is sufficient to obtain the information necessary for determination of tolerability.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

Under this project, the used species will be the rat. This species is the most commonly used rodent species for developmental and/or reproductive toxicology testing. Rats will be obtained from certified breeders/suppliers and will be transported with a registered and approved animal courier.

Age and sex:

All animals will be non-pregnant females, as only the tolerability of high levels of PCN in the species rat will be tested during this dose range finding study. Age of the selected animal species should be representative for the human situation; young adult animals will be used, but if necessary, the age of the animals may be adapted.

Table 1: number of animals

Type of study, species and guideline(s)	Number of animals/study/group	Primary outcome measures
Dose Range Finder Study	<ul style="list-style-type: none"> - To determine maximum tolerated dose level for Main Study - Max 4 groups of 3 rats /group - In total max. 12 rats / study 	CS, BW, FC Macroscopy

Common practice is to use the least amount of animals to achieve the study goals. More animals may be required than specified above either as replacement due to interim sacrifices, unexpected toxicity or

health issues. In case one or more of the above-mentioned criteria are applicable, the rationale/reason will be amended after consultation (and approval) of the AWB.

In case of a killed animal, which is not related to the study or treatment (with euthanasia of a planned study animal based upon a humane endpoint), this animal may be replaced by a spare animal.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

As information on the tolerability of PCN, our model compound, at higher dose levels in the rat is lacking in literature, this Dose Range Finding study will be performed prior to the start of the main study, to allow proper dose level selection.

Replacement

This Dose Range Finding study will be performed to test the tolerability of PCN in rats at high concentrations in order to select appropriate dose levels for the main study of this project. As the main study will be performed in rats, and relevant literature is lacking regarding the tolerability of PCN, this Dose Range Finding study will be performed in other to gather useful data for the dose levels selection for the main study. As such, a similar model will be used as described for the main study.

Reduction

The studies within this project application are designed to obtain maximal information from the smallest number of animals. Based on our extended experience with this type of range finder study, 3 animals/dose group is sufficient to obtain the information necessary for determination of tolerability.

Refinement

This study assesses the liver-mediated thyroid toxicity after prenatal exposure in the rat. This pilot (Dose Range Finder) study with PCN will be performed in non-pregnant rats, to confirm that PCN is tolerated at the highest dose level selected based on literature data. This will allow us to set the dose level of the high dose group, as currently experience with the test compound in the rat at higher dose levels is not available from literature. Once the high dose level is selected, the dose levels for the other groups will be determined based on the BDM approach (also see Project Voorstel 1.3 Main Study) and the main *in vivo* study can be performed.

The species under this project are rats, the most commonly used species for non-clinical safety testing programs. Extensive historical use of this species has accumulated substantial experience and background data, which may facilitate the interpretation of experimental results.

Animal welfare is of utmost importance. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g. play items and shelters for rodents).

Animals are checked multiple times per day to timely detect discomfort and/or humane end points. In case an animal shows clear adverse effects or is in pain, the animal will be observed more intensive and a veterinarian might check the animal regularly. Small treatment such as cooling, supportive feeding,

cleaning of wounds might be acceptable within the scope of the study. In case of animals reaching the humane end point, the animal will be removed from the study and will be sacrificed in extremis, to prevent further suffering.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Selection of a suitable dose level will take into account any available data from literature, but assumptions have to be made in such extrapolation and occasionally unwanted adverse effects may arise from the selected dose level.

Analgesia or veterinary treatment will be performed if this is compliant with the study. The veterinarian and study director will be involved in the decision making for performing a treatment.

In the event of an animal showing severe clinical signs, study director, designated veterinarian and AWB can/will be involved deciding on either modification of study design, withdrawal from treatment, provision of preventative or therapeutic treatments, or humane killing (HEP) of affected animals.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Repetition of studies will be avoided as much as possible, which is also supported by legislation. The study history of PCN was queried to avoid repetition, i.e. literature review was performed by the project group on PCN to select the dose levels and administration route for the in vivo study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Anesthesia will be used prior to euthanasia of animals. In general, no anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain putatively caused by PCN as this is not compliant with the study objectives. Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Adverse effects caused by PCN (most of the times with mild but in case of the Dose Range Finder Study potentially to severe discomfort) are the most likely adverse effects to be observed.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the Dose Range Finder is to determine the tolerability of PCN. Although the levels will be based on information available from literature, unexpected high toxicity may occur after PCN administration, but this is not likely.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The animals will be closely monitored daily in order to make sure that animals will be timely sacrificed according to humane endpoints, or treatment can be terminated or temporarily stopped for recovery purposes. A veterinarian will be involved during this process.

In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

Animals will always be group housed and a standard level of cage enrichment will be applied according animal needs, best practice and standards.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The procedural-related incidence of reaching humane endpoints is estimated as very minimal (< 1 animal). The incidence of reaching humane endpoints as a result of a response to PCN is estimated as minimal.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

For the Dose Range Finding Study, the severity level could occasionally increase to severe, in case of unexpected toxicity caused by the administration of the model compound. This is however unlikely and based on the performed procedures, the cumulative severity classification for the study will be moderate, at the most.

Main procedures and their discomfort level:

- Administration (of model compound): mild
- Body weight: mild
- Clinical observation: mild
- Confinement and restraint: mild
- Removal of hair: mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be killed at the end of the treatment period using an oxygen/carbon dioxide procedure, followed by carbon dioxide procedure. During necropsy, macroscopic findings will be documented, but no organs or tissues will be weighed or collected.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Main Study (Part A + B)

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The study procedures are performed to monitor relevant maternal and offspring liver and thyroid parameters after prenatal exposure to the liver enzyme inducer pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN), using Benchmark Dose (BMD) modelling in order to define quantitative relationships between the first three key events in the Adverse Outcome Pathway (AOP).

The study consists of an acclimation phase and treatment phase. During the acclimation phase animals will be habituated to their environment which promotes both animal welfare and reproducible experimental results. In the treatment phase PCN is administered by oral gavage, followed by specific observation of the animals, collection of body fluids, organs/tissues and fetuses (Part A) or pups (Part B) for subsequent analysis.

The Main study is sub-divided into two parts: Part A and Part B. For all animals, treatment will be once daily by oral gavage on Days 6-20 post-coitum. This period will cover the stage of in utero brain development that is sensitive to maternal thyroid hormone level changes. Part A aims to investigate the maternal and fetal effects of PCN, whereas Part B aims to investigate the maternal and pup effects of the PCN.

For Part A, necropsy of the pregnant females will be performed on Day 21 post-coitum. The following investigations will be performed in Part A:

- Twice daily mortality check, daily clinical observations, and body weight and food consumption measurements at regular intervals.
- Blood sample collection from all dams on two time points post-coitum (one day during pregnancy and on the day of necropsy) for determination of rT3, total T3, total T4 and TSH concentrations.
- Blood sample collection on a maximum of six time points at the end of the post-coitum period to

determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN.

- Blood sample collection from the fetuses on Day 21 post-coitum. Samples will be pooled per litter to determine at least total T4 concentrations. In case sufficient blood is available, also rT3, total T3 and TSH will be measured.
- Collection of the liver and thyroid from all dams. Organs will be weighed and the liver will be divided into four parts.
 - * One part of the liver will be evaluated microscopically using H&E slides by a veterinary pathologist.
 - * One part of the liver will be used for rT3, T3 and T4 determination and the measurement of D1 and D3 activity.
 - * One part of the liver will be used for measurement of T4-UGT and T2-SULT activity.
 - * One part of the liver will be used for qPCR measurements to determine expression levels of UGT, SULT, OATP, and MCT genes.
- Collection of the liver, thyroid and brain from all fetuses. The brains will be dissected into cerebellum, hypothalamus, pituitary and cortex tissue. Brain sections will be pooled per litter to obtain sufficient tissue to determine amongst others thyroid hormone receptor, rT3, total T3, total T4, and mRNA transporters.

The remaining blood and tissues will be kept for possible future additional measurements.

For Part B, litters will be culled to a size of 8 pups/litter on postnatal day (PND) 4. Necropsy of the dams and remaining pups will be performed on PND 21. The following investigations will be performed during Part B:

- Twice daily mortality check, daily clinical observations, and body weight and food consumption measurements at regular intervals.
- Blood sample collection on a maximum of six time points at the end of the post-coitum period to determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN.
- Blood sample collection from all dams on PND 21 for determination of rT3, total T3, total T4 and TSH concentrations.
- Blood sample collection from the culled pups on PND 4. Samples will be pooled per litter to determine at least total T4 concentrations. In case sufficient blood is available, also rT3, total T3 and TSH will be measured.
- Blood samples will be collected on PND 21 from the pups and pooled per litter to determine levels of rT3, total T3, total T4 and TSH.
- Collection of the liver and thyroid from all dams. Organs will be weighed and the liver will be divided into four parts.
 - * One part of the liver will be evaluated microscopically using H&E slides by a veterinary pathologist.
 - * One part of the liver will be used for rT3, T3 and T4 determination and the measurement of D1 and D3 activity.
 - * One part of the liver will be used for measurement of T4-UGT and T2-SULT activity.
 - * One part of the liver will be used for qPCR measurements to determine expression levels of UGT, SULT, OATP, and MCT genes.
- Collection of the liver, thyroid and brain from all culled pups on PND 4. The brains will be dissected into cerebellum, hypothalamus, pituitary and cortex tissue. This will be pooled per litter to obtain sufficient tissue to determine rT3, total T3 and total T4.
- The liver, thyroid and brain will be collected from all pups on PND 21. The brains will be dissected into cerebellum tissue and cortex tissue. This brain sections will be pooled per litter to obtain sufficient tissue to determine amongst others thyroid hormone reception, rT3, total T3, total T4 and deiodinase.

The remaining blood and tissues will be kept for possible future additional measurements.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

As described above, during the study, the following type of animal procedures may be conducted:

- *Administration*: to achieve the study objectives animals may receive vehicle, or PCN in the study period. Substances will be administered by oral gavage. The administration of vehicle or PCN will be applied such that the severity will no more be than transient mild and that no lasting harm occurs. Animals will be repeatedly dosed by, once daily between days 6-20 post-coitum. This period covers the stage of in utero brain development that is sensitive to maternal thyroid hormone level changes.

- *Blood sampling*: blood will be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels (e.g. for adults during pregnancy and postnatal phase), major blood vessels / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia) / decapitation (for fetuses and young pups). The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits, according to animal ethical standard procedures and approved by the animal welfare body (AWB).
- *Body weight*: body weight will be determined at regular intervals to assess the health condition of the animal. Frequency may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Clinical observation*: clinical signs will be determined at least once daily to assess the health condition of the animal. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Collection of fetuses*: for assessment of developmental toxicity, fetuses will be collected at the end of the post-coitum period by caesarian section and might be subjected to detailed fetal examinations (Part A only).
- *Confinement and restraint*: one or more of the following methods may be used: manual restraint, short term separation (e.g., for observation purposes), single housing during post-coitum phase.
- *Culling*: to reduce variability among the litters, culling might be performed (Part B only). Usually this is done on postnatal day 4 at which eight pups from each litter of equal sex distribution (if possible) will be randomly selected to continue on the study. Of the culled pups blood samples will be taken, internal sex may be determined and a macroscopic evaluation may be performed and tissues will be collected for further analysis.
- *Removal of hair*; may be performed by chemical or mechanical removal in order to facilitate local observations and/or support recovery of underlying surface.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are at least reviewed by Animal Welfare Body and study director. Compliance to these present SOPs will be monitored by Quality Assurance Officers, management, the study director and the Animal Welfare Body.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The total number of animals per group is based on the benchmark dose (BMD) approach. The BMD approach allows detailed dose-response assessment, comparison of relative sensitivities of different parameters and determination of point of departure. Advantages over the classical NOAEL/LOAEL approach include the use of all data for dose-response analysis, the independence of the BMD of selected doses used in the study design, and the possibility of adverse outcome pathways. The BMD approach is most beneficial when built upon a study design with enhanced dose groups numbers, without the need for increasing the number of animals in the entire study.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

Under this project the used species will be the rat. This species is the most commonly used rodent species for developmental and/or reproductive toxicology testing. Time-mated female rats will be obtained from certified breeders/suppliers and will be transported with a registered and approved animal courier. Animals will arrive at the Test Facility on Day 0 or 1 post-coitum (Day 0 post-coitum is the day of successful mating). Animals will be approximately 10-14 weeks at mating.

Age and sex:

All animals will be time-mated females.

Age of the selected animal species should be representative for the human situation; young adult animals will be used, but if necessary, the age of the animals may be adapted.

Table 1: number of animals per study

Type of study	Number of animals/study/group	Primary outcome measures
Part A	<p><u>F0-generation:</u> 12 females in the control group 6 females/dose group (8 dose groups)</p> <p><u>F1-generation:</u> approximately 720 fetuses (60 litters x 12 fetuses).</p> <p>In total max. 780 rats</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CS, BW, FC - Blood collection - Macroscopy - Histopathology + organ weight of selected organs - Endocrine disruptor endpoints (thyroid (hormone) measurements) - Pre- and post-implantation loss - Fetal weights - External examination fetuses (including sex determination)
Part B	<p><u>F0-generation:</u> 12 females in the control group 6 females/dose group (8 dose groups)</p> <p><u>F1-generation:</u> approximately 720 pups (60 litters x 12 pups).</p> <p>In total max. 780 rats</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CS, BW, FC - Blood collection - Macroscopy - Histopathology + organ weight of selected organs - Endocrine disruptor endpoints (thyroid (hormone) measurements) - Early post-natal development
Females that will be added to Part A or Part B to replace non-pregnant females or females sacrificed preterm. Additional females will be distributed over the two parts for additional data collection. ¹	<p><u>F0-generation:</u> 6 females in the control group 3 females/dose group (8 dose groups)</p> <p><u>F1-generation:</u> approximately 360 fetuses or pups (30 litters x 12 fetuses or pups)</p> <p>In total max. 390 rats</p>	<ul style="list-style-type: none"> - See above, will depend on which part (A or B) the females will be added.

Common practice is to use the least amount of animals to achieve the study goals. More animals may be required than specified above either as addition or replacement due to inclusion of spare animals, due to interim sacrifices, unexpected toxicity or health issues.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

¹ In total, the study will consist of 9 groups: one vehicle control and 8 dose levels. The control group will consist of 30 time-mated female rats with the aim to obtain at least 24 pregnant females. The eight dose groups will consist of 15 time-mated female rats each with the aim to obtain at least 12 pregnant females per group. The total number of pregnant females per group will be divided over Part A and Part B, which will result in a minimum of 6 females (12 in control)/group in Part A and 6 females (12 in control)/group in Part B. The remaining females, a maximum of 6 pregnant females in the control group and 3 pregnant females/dose group, will be added to either Part A or Part B. All females will be dosed during the study.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Although the relation between thyroid hormones and liver enzymes has been studied extensively in adult rats, the consequences of such changes in pregnant rats for embryo-fetal and postnatal development have not been studied in that much detail. However, the role and understanding of thyroid hormones in pre- and postnatal development is becoming of more importance as the OECD guideline studies on developmental and reproductive toxicology (OECD TG 421, 422 and more recently OECD414) were update with thyroid measurements. In order to obtain understanding regarding the relevant adverse outcome pathways, the main study of this project was designed as such.

Replacement

For meaningful and reliable evaluation of overall model compound effect/toxicity, target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. Thus far, in vitro and ex-vivo test systems remain insufficient for comprehensive determination of reproductive and developmental toxicity. As such, the requested animal studies in this project application are all designed to support requirements for which alternative testing is not available.

Reduction

The studies within this project application are designed to obtain maximal information from the smallest number of animals. In general, the number of animals used is considered to be the minimum needed to satisfy evaluation criteria. The total number of animals per group is based on the benchmark dose (BMD) approach. The BMD approach allows detailed dose-response assessment, comparison of relative sensitivities of different parameters and determination of point of departure. Advantages over the classical NOAEL/LOAEL approach include the use of all data for dose-response analysis, the independence of the BMD of selected doses used in the study design, and the possibility of adverse outcome pathways. The BMD approach is most beneficial when built upon a study design with enhance dose groups numbers, without the need for increasing the number of animals in the entire study. Therefore, the studies were designed to optimize dose group sizes, number of dose groups, and number of animals per dose group, based on our existing expertise with pragmatic study designs optimized for benchmark modelling.

Refinement

This study assesses the liver-mediated thyroid toxicity after prenatal exposure in the rat. Data on exposure and tolerability of PCN at higher concentrations will be obtained from the Dose Range Finder study in order to enable proper dose selection, sample size and experimental conditions prior to the start of the Main study, allowing optimization of the design and end-points.

The species under this project are rats, the most commonly used species for non-clinical safety testing programs. Extensive historical use of this species has accumulated substantial experience and background data, which may facilitate the interpretation of experimental results; furthermore, its size permits repeated collection of analytical samples with minimal physiological impact, which in turn reduces the group size required to fulfil the scientific objectives of the study.

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g. play items and shelters for rodents, and chew blocks and human interaction for dogs). Further, attention is given evaluate environmental enrichment items and communicate on practices between sites.

Animals are checked multiple times per day to timely detect humane end points. In case an animal shows clear adverse effects or is in pain, the animal will be observed more intensive and a veterinarian might check the animal regularly. Small treatment such as cooling, supportive feeding, cleaning of wounds might be acceptable within the scope of the study.

5.1 lid2h is actively involved within the Dutch Three Rs centre, and regularly interacts with global regulatory agencies and European Lab Animal Science (FELASA) network, and thus is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within

regulatory testing and 5.1 lid2H research. Within the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimize animal numbers or to reduce the severity level. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

The majority of animals are not expected to show signs of adverse effects of the model compound that impact on their general well-being (any signs of adversity are expected mainly in the Dose Range Finder Study that is performed prior to the Main Study). Selection of a suitable dose level will take into account any available data from literature and the Dose Range Finder Study, but assumptions have to be made in such extrapolation and occasionally unwanted adverse effects may arise from the selected dose level.

Analgesia or veterinary treatment will be performed if this is compliant with the study. The veterinarian and study director will be involved in the decision making for performing a treatment.

In the event of an animal showing severe clinical signs, study director, designated veterinarian and AWB can/will be involved deciding on either modification of study design, withdrawal from treatment, provision of preventative or therapeutic treatments, or humane killing (HEP) of affected animals.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Repetition of studies will be avoided as much as possible, which is also supported by legislation. The study history of PCN was queried to avoid repetition, i.e. a literature review was performed by the project group on the model compound to select the dose levels and administration route for the in vivo study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Anesthesia will be used prior to euthanasia of animals and/or during blood or tissue collection. In general, no anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain putatively caused by model compound as this is not compliant with the study objectives. Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Effects caused by PCN are the most likely adverse effects to be observed. In addition, unexpected adverse effects caused by the dosing method, sampling of body fluids, single housing and restraining could occur.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the project is to cause thyroid modulation using PCN as a model compound. An adverse effect might occur with higher than expected severity during the study after PCN administration, but this is not likely as the dose levels will be selected based on the outcome of the Dose Range Finder Study in which the tolerability of the model compound will be assessed.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The animals will be closely monitored daily in order to make sure that animals will be timely sacrificed according to humane endpoints, or treatment can be terminated. A veterinarian will be involved during this process.

In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

If scientifically and practically possible, animals will always be group housed (with exception of during the post-coitum phase) and a maximum level of cage enrichment will be applied according animal needs, best practice and standards.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as very minimal (<1%).

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The allowed cumulative severity classification for the study will be moderate, at the most.

Main procedures and their discomfort level:

- Administration (of model compound): mild
- Blood sampling: moderate
- Body weight: mild
- Clinical observation: mild
- Collection of fetuses: non-recovery
- Confinement and restraint: mild
- Culling: non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be killed at the end of the treatment period using the oxygen/carbon dioxide procedure, followed by carbon dioxide procedure. During necropsy, organs and tissues will be collected for histopathology, organs will be weighed and fetuses might be collected (Part A only). Additional tissue samples might be collected for future investigations/ new research purposes (separate Project Proposal).

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Onderzoek naar de lever-gemedieerde schildklier toxiciteit na prenatale blootstelling aan een lichaamsvreemde stof in de rat.
1.2 Looptijd van het project	27 Sep 2019 tm 31 Dec 2019 (dierexperiment)
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Lever, Schildklier, Zwangerschap, Hersenontwikkeling, Blootstelling

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Schildklierhormonen zijn onmisbaar voor de ontwikkeling van de hersenen van de embryo en foetus tijdens de zwangerschap. De foetus is gedurende het eerste trimester van de zwangerschap afhankelijk van de hoeveelheid schildklierhormoon van de moeder. Pas later in de zwangerschap speelt de eigen schildklierhormoon productie een rol. Een afname van schildklierhormonen in het bloed van de moeder in de vroege zwangerschap - en later in de zwangerschap bij de foetus - kan zorgen voor onomkeerbare schade in de ontwikkeling van de hersenen.</p> <p>Van bepaalde lichaamsvreemde stoffen (xenobiotica) is het bekend dat deze de hoeveelheid schildklierhormoon in het lichaam beïnvloeden. Voornamelijk door een verhoogde omzetting van schildklierhormoon in de lever. Hoewel</p>
---	---

het effect van xenobiotica veel is onderzocht in volwassen ratten, is het effect van deze stoffen tijdens de zwangerschap niet goed onderzocht.

Met deze serie experimenten willen we vaststellen of verlaging van schildklierhormoon concentraties door xenobiotica leidt tot negatieve effecten op de ontwikkeling van het embryo en de foetus.

Doelstelling

Het doel van dit project is daarom het karakteriseren van het effect van lever-gemedieerde schildklier toxiciteit op de ontwikkeling van het embryo, de foetus en de pup.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

De opbrengsten van dit project zullen de basis leggen voor het definiëren van de interacties op moleculair gebied en de samenwerking tussen de lever en schildklier en daarbij de gevolgen van een verstoring van deze samenwerking tijdens de zwangerschap op de (nog ongeboren) nakomeling.

Naast dat deze fundamentele kennis een groot wetenschappelijk belang dient, zal deze van grote waarde zijn bij de interpretatie van de data uit vele dierstudies die worden uitgevoerd als onderdeel van de veiligheidsevaluatie van chemische stoffen. Recentelijk zijn namelijk aan veel van deze zogenaamde richtlijnstudies specifieke parameters toegevoegd welke de hormoon verstorende werking van een stof moeten opmerken. Echter, de interpretatie van deze fysiologische en hormonale veranderingen (met betrekking tot hormoonontregeling) in deze dierstudies, zeker in de afwezigheid van gelijktijdige waargenomen nadelige gezondheidseffecten, is momenteel nog controversieel binnen de regulatoire toxicologie.

Gezien de voortdurende controverse over het definiëren van hormoonontregelaars, is het belangrijk dat de basiskennis over het werkingsmechanisme, die nu nog onvoldoende is, wordt uitgebreid.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Rat ca. 2112 (Pilot Studie en Hoofd Studie deel A en B)
Pilotstudie = ca. 12 volwassen ratten
Hoofdstudie (Part A and B) = 150 volwassen ratten + ca. 1950 foeten en pups.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

De dieren kunnen ongemak, stress of pijn ondervinden door de toediening van de modelstof die wordt gebruikt in deze studie. Dit kan enerzijds door de manier waarop de modelstof wordt toegediend (oraal), onverwachte klinische symptomen van de toediening van de stof, of de studie-specifieke procedures die worden uitgevoerd tijdens deze studie, zoals het afnemen van bloed. Daarnaast kunnen negatieve gevolgen worden ondervonden door eventuele (tijdelijke) wijze van huisvesting.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Op grond van jarenlange ervaring met een groot aantal van soortgelijke dierexperimenten en op basis van de uit te voeren studie-specifieke dierhandelingen, wordt het totale ongerief van de huidige dierproeven ingeschat op mild tot matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden in het kader van de proef geëuthanaseerd. Dit is nodig voor onderzoek aan organen of weefsels om de effecten van de modelstof na te gaan.

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Voor een betekenisvolle en betrouwbare evaluatie van het mogelijke effect van de modelstof is het belangrijk dat de fysiologische doelwitsystemen intact zijn, waarbij zenuwen en humorale systemen samen kunnen werken en hierdoor de reacties van het lichaam kunnen aansturen. Tot nu toe blijven alternatieven onvoldoende om uitgebreide studies uit te voeren die betrekking hebben op de reproductie van een organisme en de ontwikkeling van een embryo, foetus en de geboren nakomelingen, en is het hierdoor nodig om de beschreven dierstudies uit te voeren.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Er is een literatuurstudie gedaan naar de effecten van de modelstof en er zal in een klein vooronderzoek de juiste maximale dosering worden bepaald (de "Pilot Studie"). Daarnaast is er voor gekozen de studie opzet (vb. aantal doseergroepen en aantal dieren per groep), te baseren op de zogenaamde Bench Mark-aanpak, welke uit gaat van een groter aantal doseergroepen, met minder dieren per groep, om zo tot een betere schatting te kunnen komen van de relatie tussen de blootstelling en het beoogde effect (op een groot aantal verschillende eindpunten).

4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Voor dit project zullen ratten gebruik worden. De rat is de meest gebruikte diersoort voor het bestuderen van mechanistische verbanden tijdens reproductie. Hierdoor is er veel ervaring met deze diersoort en bestaat er veel informatie over de diersoort en zijn normale gedrag, waardoor de interpretatie van de resultaten van het project beter geëvalueerd kunnen worden en vergeleken met de bestaande literatuur.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dierproeven worden, na interne goedkeuring door de Instantie voor Dierwelzijn (IvD), uitgevoerd volgens een vooraf vastgesteld protocol dat op basis van internationaal vastgelegde richtlijnen is opgesteld. Alle dierhandelingen worden aan de hand van goedgekeurde procedures uitgevoerd. De continue zorg voor het welzijn van de dieren door de ervaren onderzoekers tijdens de experimenten houdt de negatieve gevolgen zo beperkt mogelijk. De dierenarts is ten alle tijden beschikbaar voor controle en eventuele kleine behandelingen. Dieren die pijn, stress of ongemak van 'niet tijdelijke aard' vertonen met kans op verergering, zullen worden geëuthanaseerd om langer of erger lijden te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 24 juli 2019 09:48
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486
Bijlagen: bijlage_beschrijving_dierproeven_1.3.docx; aanvraag_projectvergunning_1.1.docx; NTS_niet_technische_samenvatting_lvD.docx; bijlage_beschrijving_dierproeven_1.3_1.docx; format_projectvoorstel_1.2_lvD.docx; aanvraag_projectvergunning_1.1.pdf

Categorieën: Nieuwe aanvraag (of nummer): 5.1 lid2e

6

Geachte leden 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat." en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 20198486.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van de beveiligde verbinding.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 24-07-2019, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 24-07-2019 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 24 juli 2019 09:50
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: Verzoek om advies AVD 5.1 lid2h 20198486 verstuurd aan DEC

7

Geachte meneer, mevrouw,

Op 19-07-2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20198486.

Uw aanvraag is naar 5.1 lid2h gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD **5.1 lid2e** 20198486
Bijlagen
2

Datum 24 juli 2019
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte drs. Emmen,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 juli 2019. Het gaat om uw project "Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD **5.1 lid2e** 20198486. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

24 juli 2019

Aanvraagnummer:

AVD 1.1029 20198486

Datum:
24 juli 2019
Aanvraagnummer:
AVCS.1 lid2h 0198486

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 5.1 lid2h
Naam instelling of organisatie: 5.1 lid2h
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 5.1 lid2e
Postbus: 5.1 lid2h
Postcode en plaats: 5.1 lid2h

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 5.1 lid2e
Functie: 5.1 lid2h
Afdeling: Toxicologie
Telefoonnummer: 5.1 lid2h
E-mailadres: 5.1 lid2e

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 5.1 lid2e

Functie: 5.1 lid2e

Afdeling: Toxicologie

Telefoonnummer: 5.1 lid2h

E-mailadres: 5.1 lid2e

Datum:

24 juli 2019

Aanvraagnummer:

AVD 1920 511 0198486

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 27 september 2019

Geplande einddatum: 31 december 2019

Titel project: Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.

Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de lever-gemedieerde thyroid toxiciteit na prenatale blootstelling in de rat.

Naam DEC: 5.1 lid2h

Postadres DEC: 5.1 lid2h

E-mailadres DEC: 5.1 lid2h

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.885,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 5.1 lid2e
Functie: 5.1 lid2e
Plaats: 5.1 lid2h
Datum: 19 juli 2019

Datum: 24 juli 2019
Aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 20198486



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 0198486
Bijlagen
2

Datum 24 juli 2019
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 juli 2019
Vervaldatum: 23 augustus 2019
Factuurnummer: 198486

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486	€ 1.885,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e namens Info-zbo
Verzonden: maandag 16 september 2019 11:19
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: lange doorlooptijd 8486, RE: DEC-advies 5.1 lid2h

13

Beste 5.1 lid2e

Bedankt voor het op de hoogte stellen over het proces betreffende 8486. Als de DEC van mening is dat het een complexe aanvraag betreft, dan kan dit worden aangegeven in het advies. De CCD kan de aanvraag dan complex maken. Er zouden dan 15 werkdagen beoordeeltijd extra bij de 40 werkdagen komen.

Hopende je hiermee voldoende te hebben geïnformeerd,

Met vriendelijke groet,
5.1 lid2e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: woensdag 11 september 2019 16:22
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: lange doorlooptijd 8486, RE: DEC-advies 5.1 lid2h

11

Beste 5.1 lid2e

Bedankt voor het bericht. Wij zijn met dit advies iets over de 20 werkdagen heen gegaan.

Ik wil alvast melden dat wij voor het advies 8486, waar wij nog mee bezig zijn, ook over de 20 dagen heen gaan, en waarschijnlijk aanzienlijk meer. Dat zal al snel rond de 30 liggen. Het spijt me zeer. Het is een lastig dossier en een moeizaam proces, ook door de afgelopen vakantietijd. Zou het misschien goed zijn daarvoor verlening aan te vragen? Of kijk je eerst of de CCD de verlenging toevallig kan compenseren?

Wij gaan nog harder ons best doen dit niet meer te laten gebeuren.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e On Behalf Of Info-zbo
Sent: Wednesday, September 11, 2019 15:22
To: 5.1 lid2e
Subject: RE: DEC-advies 5.1 lid2h

10

Beste 5.1 lid2e

Het advies is in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: dinsdag 10 september 2019 21:37

Aan: 'Info-zbo' <info@zbo-ccd.nl>

Onderwerp: DEC-advies 5.1 lid2h

9

Beste mensen,

Hierbij ons advies bij project 5.1 lid2h. Het is beveiligd met een wachtwoord. Dit stuur ik apart.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: zaterdag 14 september 2019 21:12
Aan: 'Info-zbo'
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: planning advies bij dossier 8486

12

Urgentie: Hoog
Categorieën: DEC adviezen

Beste mensen,

Graag wil ik laten weten dat we met dossier 8486 over de 20 dagen heen gaan. We komen rond de 30 uit. Het is een zeer complex dossier.

Ik probeer het advies deze week op maandag, dinsdag of woensdag in te dienen. Qua vergaderschema zitten we dan in de 'gele periode'.

Graag hoor ik:

- Of het nog mee kan naar de eerstvolgende CCD-vergadering.
- Wanneer het dan uiterlijk binnen moet zijn.

Zo niet, dan zal verlening geregeld moeten worden. Ik vind het dan ook wel prettig om te weten dat haasten geen zin heeft. Maar als het wel zin heeft, maak ik graag ruimte in mijn agenda om het advies zo snel mogelijk in te dienen.

In cc onze voorzitter, die ik ook graag op de hoogte wil houden.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e
5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2e

Van [redacted]
Verzonden: donderdag 19 september 2019 21:37
Aan: 'Info-zbo' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: RE: advies bij AVD2019-5.1 lid2h 8486
Urgentie: Hoog

20

Beste 5.1 lid2e

Bedankt voor je begrip. Ik heb inderdaad nog geen FileSecure. Daar wordt aan gewerkt.

Hierbij de zip-map, zoals je voorstelt als tweede optie. Werkt dit voor jou? Hebben jullie het wachtwoord nog dat ik eerder meestuurde? Of zal ik dat nog eens opsturen?

Mocht je het nodig hebben en ik reageer niet direct, bel of app me dan op 5.1 lid2e. Eventueel zeg ik het door de telefoon.

Tot slot: wij vonden het een complex dossier. Niet vanwege extra bijlagen, maar vanwege de complexe inhoudelijke materie. Ik weet niet of de CCD dit wil volgen en het formeel aan wil merken als complex. Wij hebben wel al 31 werkdagen verbruikt. Dit is uiteraard een uitzondering. We wilden uiteraard zorgvuldig adviseren en hadden deze tijd echt nodig.

Hopelijk is het nu in kannen en kruiken. Anders hoor ik het.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e
5.1 lid2h

5.1 lid2e

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Sent: Thursday, September 19, 2019 16:38
To: 5.1 lid2h
Subject: RE: advies bij AVD2019-5.1 lid2h 8486

19

Beste 5.1 lid2e

Geeft niet dat het niet meteen vlekkeloos verloopt. We helpen je er wel doorheen.

We hebben voor de verwerking bij ons liever alle documenten apart, dat scheelt ons een hele berg tijd.

Als je vanavond alles opnieuw kunt sturen, is dat prima. Ik ga er dan morgen weer mee aan de slag. Ik begrijp dat je nog niet met file-secure kunt werken? Bestanden verzegeld met filesecure hebben onze grote voorkeur (dit is het meest veilig). Als dit nog niet kan, dan kun je het beste de bestanden in een zip-bestand sturen met wachtwoord.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: donderdag 19 september 2019 16:25
Aan: 'Info-zbo' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: RE: advies bij AVD2019 5.1 lid2h 8486

18

Beste 5.1 lid2e

Dat vroeg ik mij ook net af: of jullie dan de actuele aanvraag wel hebben. Ik moet ook nog wennen.

Ik heb van de aanvraag een verzameldocument gemaakt. Is dat goed of heb je liever die documenten allemaal los?

Ik ga het vanavond in alle rust even allemaal opnieuw klaarmaken en toesturen, anders maak ik weer nieuwe fouten, en ik neem jouw antwoord op de voorgaande vraag dan mee.

Misschien kun je het ingestuurde het beste allemaal verwijderen, om verwarring te voorkomen. Ik stuur alles wel opnieuw. Ook met de vragen in het adviesformulier. Is dat goed?

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Sent: Thursday, September 19, 2019 13:39
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2h
Subject: RE: advies bij AVD2019 5.1 lid2h 8486

17

Beste 5.1 lid2e

Nu toch nog een verzoekje (sorry, net terug van vakantie, ik moet er nog even in komen geloof ik 😊). Ik zie dat de gestelde vragen en antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. Het is dan ook gebruikelijk dat de DEC de aangepaste aanvraag meestuurt met het DEC advies. Zo weten wij zeker dat we de laatste versie van de aanvraag in behandeling nemen.

Zou je de laatste versie van de aanvraag (projectvoorstel en bijlagen) kunnen sturen?

Alvast bedankt.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 19 september 2019 07:57
Aan: 'Info-zbo' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: RE: advies bij AVD2019 5.1 lid2h 8486

16

Beste 5.1 lid2e

Ik moet even aan de bel trekken. Ik bedacht laat in de avond opeens dat ik de vragen aan de onderzoeker en de antwoorden er nog niet in heb gezet. Hierbij in bijlage. Zal ik nog even een nieuw advies maken met deze tekst in het formulier geplakt? Ik wilde je in elk geval z.s.m. iets laten weten.

Sorry voor het ongemak. Wij moeten binnen de **5.1 lid2h** nog even wennen aan elkaars werkwijze.

Hartelijke groet,

5.1 lid2e

From: **5.1 lid2e** On Behalf Of Info-zbo
Sent: Wednesday, September 18, 2019 22:12
To: **5.1 lid2e** **15**
Subject: RE: advies bij AVD2019 **5.1 lid2h** 8486

Beste **5.1 lid2e**

Het advies is in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: **5.1 lid2e**
Verzonden: woensdag 18 september 2019 16:18
Aan: 'Info-zbo' <info@zbo-ccd.nl>
Onderwerp: advies bij AVD2019 **5.1 lid2h** 8486

14

Beste mensen,

Hierbij het advies van de **5.1 lid2h** bij projectvoorstel AVD2019 **5.1 lid2h** 486.

Het is beveiligd. Het wachtwoord stuur ik apart.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e
5.1 lid2h

5.1 lid2e

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u

niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD2019-5.1 lid2h 8486
2. Titel van het project : Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat
3. Titel van de NTS : Het effect van verlaagde schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : 5.1 lid2h
 Naam contactpersoon : 5.1 lid2e
 Emailadres contactpersoon : 5.1 lid2h

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 24-7-2019
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 8-8-2019
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-08-2019 tot 26-08-19 en 10-09-19 tot 11-09-2019
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag: 26-8-2019 en (enkel de NTS) 11-9-2019
 advies aan CCD: 18-9-2019

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 14-8-2019 en 10-9-2019
- Datum antwoord: 26-8-2019 en 11-09-2019
- Gestelde vragen en antwoorden: zie hieronder.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vragenronde 1:

Bij het Project proposal:

1. In de inleiding schrijft u "To develop an adverse outcome pathway (AOP) for the effect of increased maternal TH metabolism on fetal and neonatal brain development, quantitative relationships have to be determined between the molecular initiating event (MIE), the subsequent key events (KE), and the ultimate adverse outcome, and will be the aim of this multi-stakeholder project." De DEC heeft echter moeite te begrijpen hoe u de MIE, KE en *ultimate adverse outcome* kunt relateren aan de beschreven parameters. Kunt u deze begrippen en hun kwantitatieve relaties toelichten in samenhang tot dit project? In de bijlage wordt immers beschreven dat u thyroïdehormoon-levels gaat bepalen in moederdier en nakomelingen, en leverparameters in moederdieren. Er wordt niet uitgelegd hoe deze kwantitatief gerelateerd kunnen worden aan de vermelde *adverse outcome*.

Antwoord:

Ten eerste moeten wij verduidelijken dat het overkoepelende project bestaat uit meerdere delen, die gefaseerd zullen worden uitgevoerd. De eerste fase van het project zal bestaan uit het uitvoeren van de dierproef zoals beschreven in de aanvraag. Tijdens deze dierproef zal worden gekeken naar het effect van PCN op de lever, wat in theorie de waardes van de schildklierhormonen in de moederdieren zal beïnvloeden. Door tijdens deze studie materiaal (bloed en weefsels [thyroid en hersenen]) te verzamelen van zowel het moederdier, de ongeboren foetussen en de geboren pups in verschillende levensstadia, wordt het mogelijk om te zien welke veranderingen er op bijv. cellulair en mRNA niveau plaatsvinden die vervolgens gerelateerd kunnen worden aan de veranderingen gezien in de hormoonwaardes in het bloed. Deze fase zal dus voornamelijk naar de "molecular initiating events (MIE)" en "key events (KE)" kijken. Wanneer duidelijk is wat er gebeurt op cellulair en moleculair niveau in de rat en hoe deze cascade in relatie staat tot verschillende dose-levels (Benchmark approach), zal in de tweede fase van het overkoepelende project (niet beschreven in deze aanvraag) bekeken worden hoe de MIE en KE zich verhouden tot de "ultimate adverse outcome". Deze adverse outcome is in de humane situatie beschreven (verlaagd IQ in de nakomelingen), maar is nog niet gedefinieerd in diermodellen. Dit terwijl diermodellen wel veelvuldig (en volgens de wetgeving) gebruikt worden voor humane risicoschatting. Het tweede deel van het overkoepelende project zal dan ook ingaan op de adverse outcome in de rat (bijvoorbeeld morfologische veranderingen in hersencoupees van weefsel verzamelt in fase 1) maar ook een link leggen naar de humane situatie door een samenwerking met het [5.1 lid1c](#), waardoor de mogelijkheid bestaat om ook op humaan niveau te kunnen bepalen hoe bepaalde toe- of afnames in schildklierhormoon die worden gevonden in diermodellen, zich verhouden met wat er in de mens gebeurt. Zie ook de aanpassingen in de verschillende documenten (voorzien van comments en formatting).

2. Op basis waarvan verwacht u dat de gevonden kwantitatieve relaties transleerbaar zullen zijn naar de mens?

Antwoord:

Het is reeds bekend dat schildklierhormonen cruciaal zijn voor o.a. de ontwikkeling van de hersenen van de foetus en pasgeborene. In de literatuur staat beschreven (op basis van humane data) dat lage maternale T4 levels tijdens de zwangerschap worden gerelateerd aan een lager IQ in de nakomelingen (zie ook background, eerste alinea).

Uitgangspunt van dit project is dus dat er een probleem/risico is voor de mens, voor welke een risicoschatting in dierstudies lastig blijkt. Bovenstaande data is namelijk mede aanleiding geweest om aan richtlijn dierstudies schildklierhormoonbepalingen toe te voegen voor de humane risicoschatting op hormoon-verstorende eigenschappen van een stof. Hierdoor weten we ook dat er chemicaliën zijn die in de rat, via de lever, zorgen voor lage schildklierhormoon levels tijdens de dracht (het tweede uitgangspunt in onze studie). Echter ontbreekt er op dit moment een goede parameter om, vanuit het bepalen van de schildklierhormonen in bloed in een

rattenstudie, het risico voor de (ongeboren) mens te kunnen evalueren.

De verlaging van T4 in de mens resulteert namelijk in een verlaging van het IQ in de nakomelingen maar dit is niet eenvoudig te testen in foetussen en pups van de rat (en bovendien worden dergelijke eindpunten binnen deze richtlijn studies niet onderzocht). Met het overkoepelende project willen we daarom achterhalen welke uitkomst, meetbaar in de studies uitgevoerd in de rat, relevant is voor de risico's voor humane nakomelingen.

3. Op grond van welke informatie komt u tot de conclusie dat de stof niet direct aangrijpt op de hersenen van de ontwikkelende pups en evenmin op het thyroïde-systeem (3.2)? Welke aanwijzingen hebt u dat deze stof effecten heeft op de neurologische ontwikkeling van de pup, en als deze er niet zijn, waarom is er dan voor deze modelstof gekozen als in de inleiding wordt aangegeven dat u zich richt op neonatale hersenontwikkeling?

Antwoord:

De reden om voor PCN als modelstof te kiezen is dat deze (op basis van uitgebreide literatuur data) aangrijpt op de lever en hierdoor de schildklierhormoonconcentraties verlaagt. PCN induceert phase II lever enzymen in de volwassen rat en verhoogt de expressie van bepaalde leverenzymen (bijvoorbeeld UGT1A isozymen) en verhoogt op die manier de glucuronidatie van T4. Dit leidt tot verlaagde serum T4 concentraties en (ter compensatie) verhoogde TSH concentraties. Daarnaast is bekend vanuit de literatuur dat PCN niet direct aangrijpt op de schildklier, wat het mogelijk maakt om de lever-schildklier interactie in dit project te bestuderen. In de literatuur zijn vele andere stoffen, zoals phenobarbital en dioxine, gebruikt om de effecten op de lever en schildklier te bestuderen, maar door de directe interactie met de schildklier zijn deze stoffen niet geschikt voor dit project. Zoals ook beschreven bij vraag 1 is het juist de ontbrekende link tussen wat wordt gezien in de mens (laag T4 tijdens de zwangerschap, verlaagd IQ in nakomelingen) en wat gemeten wordt in de rat (veranderde T4 levels via de lever na blootstelling aan bepaalde stoffen) die wij in het overkoepelende project willen leggen. In fase 1 (deze dierproef) is het daarom van belang de cellulaire en moleculaire events die leiden tot de verlaagde T4 levels te definiëren, zodat we in een volgende fase van het project de link kunnen leggen naar adverse events in rat nakomelingen (en hoe deze vertaalbaar zijn naar de IQ-effecten in de mens, zie vraag 1 en 2). Het zou daarom ongewenst zijn een modelstof te kiezen die direct aangrijpt op de neonatale hersenontwikkeling. Zo ver uit de beschikbare literatuur bekend is, gebeurt dit niet bij PCN.

Bij Bijlage 1:

4. Onder A schrijft u: "The aim of the dose range finder study is to determine whether rats tolerate the highest dose level (based on available literature) for the main study." Wat is uw operationele definitie van *tolerated dose* in termen van *dose level* en effecten/ongerief. Hoe verhoudt die zich tot de beschreven experimenten in bijlage 2, waarin immers effecten op de nakomelingen worden onderzocht?

Antwoord:

Een *tolerated dose* definiëren wij als het *dose level* waarop het dier een normaal lichaamsgewicht (stoename) en voedingspatroon vertoont en waarbij geen relevante klinische symptomen (lethargie, ongecoördineerde bewegingen, buikklipping, etc.) worden waargenomen. Een getolereerde dosis is essentieel om een succesvolle dracht mogelijk te maken en vervolgens tot voldoende nakomelingen te komen. Tot nu toe is in de literatuur voornamelijk onderzoek gedaan met PCN met mannelijke ratten (vandaar onze *dose range finder* in vrouwtjes), waarbij maximaal tot 200 mg/kg/dag (oraal) of 2000 ppm (dieet) is gedoseerd. In deze studies zijn geen effecten gerapporteerd op voerconsumptie, lichaamsgewicht of klinische symptomen. Echter zijn de meeste studies uitgevoerd bij lagere concentraties en veelal voor kortere blootstellingsperiodes, waardoor we niet weten of hogere dose levels (bv. 300 mg/kg/dag) getolereerd worden door de rat bij herhaalde blootstelling. Deze *dose range finder* zal als basis dienen voor de dose levels die worden geselecteerd voor de hoofdstudie. Het effect op de lever (inductie van Phase II enzymen) wordt al bij lagere concentraties verwacht, op basis van de (beperkt) beschikbare literatuur in drachtige dieren, echter is een brede dose range gewenst om een zo optimaal mogelijke dose-response curve te kunnen maken voor de uiteenliggende parameters die in deze dierstudie onderzocht worden.

5. Kunt u aangeven wat u verwacht als *adverse effects* en hoe die verwachting zich verhoudt tot de humane eindpunten in deze bijlage?

Antwoord

Algemeen: De humane eindpunten worden gehanteerd volgens het OECD guidance document, die verder gespecificeerd zijn in Business Operating Procedures van 5.1 lid 2h waar de dierproef uitgevoerd zal worden. Een humaan eindpunt wordt hierin beschreven als de eerste indicatie in een dierexperiment van potentiële pijn en/ of ongerief die, binnen de context van de te behalen wetenschappelijke eindpunten gebruikt kan worden voor het ondernemen van acties, zoals vaker observeren of het humaan doden van het dier. Deze humane eindpunten zijn niet noodzakelijkerwijs gebaseerd op klinische symptomen, maar kunnen ook worden gebaseerd op fysiologische observaties die voorspellend zijn voor nog komend ongerief. Hieronder is o.a. gedefinieerd: het langdurig of definitief niet eten of drinken, snel en continu gewichtsverlies (>10% tussen 2 meetpunten), abnormaal uiterlijk over langere periode, ademhalingsproblemen, waarneembare bloeding en/of verstoorde mobiliteit. Zie ook toevoegingen in Bijlage 1 en Bijlage 2 – hoofdstukken 2.D Refinement en 2.J Humane endpoints (Punt 8 –vragen aan de onderzoeker).

Dose Range finder – Bijlage 1: Data uit de literatuur laat zien dat er bij 200 mg/kg/dag (7 dagen blootstelling) normale lichaamsgewichten en normale voerconsumptie worden geobserveerd en dat er geen toxicologisch relevante klinische symptomen zijn. Wel worden er effecten in (het gewicht van) de lever en/of schildklier gezien. In de dose range finder, waar we 10 dagen lang de dieren blootstellen aan concentraties boven deze 200 mg/kg/dag, verwachten we op basis van de beschikbare literatuur geen toxiciteit. Mochten de dieren tijdens de dose range finder verlies in lichaamsgewicht vertonen, al dan niet in combinatie met een sterk afgenomen voerconsumptie, en/of in combinatie met relevante klinische symptomen, zal de dosering naar beneden aangepast worden of zullen de dieren op een humane manier worden gedood (zie ook bovenstaande – algemeen humane eindpunten).

Hoofdstudie – Bijlage 2: De hoogste dosering van de hoofdstudie wordt gekozen op basis van de afwezigheid van adverse effecten op lichaamsgewicht, voerconsumptie en relevante klinische symptomen in de dose range finder. Hierdoor worden er op deze parameters geen adverse effecten verwacht in de hoofdstudie.

Wel is, zoals ook hierboven is beschreven, bekend dat PCN ook op lage doseringen, effect heeft op (het gewicht van) de lever en/of schildklier, waardoor de onderzoeksvraag beantwoord kan worden.

Als toevoeging op de punten beschreven onder punt Algemeen van dit antwoord zullen dieren die vroegtijdig werpen, dieren die moeite hebben met werpen en dieren die niet voor het nest zorgen (bijv. koude pups, pups verspreid door de kooi en/of het niet voeden van pups) worden afgevoerd, al dan niet met het bijbehorende nest.

6. Kunt u uitleggen wat u bedoeld met “short term separation” (2.A) en aangeven wat de maximale duur van deze afzondering zal zijn, daar dit als ongerief opgevat zou kunnen worden?

Antwoord:

De dieren zullen tijdens de dose range finder gezamenlijk (3 vrouwen per doseergroep) gehuisvest worden. Tijdens het doseren, wegen en observeren, zullen de dieren uit de kooi genomen worden en zullen hierdoor tijdelijk (maximaal 5 minuten per dier) afgezonderd zijn van hun kooigenoten. Nadat de handelingen zijn uitgevoerd, zullen de dieren altijd direct worden teruggeplaatst bij hun kooigenoten. Hierdoor is het ongerief zeer gering. Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 1 – Hoofdstuk 2.A en de NTS.

Tijdens de hoofdstudie zitten de dieren vanwege hun dracht en verwachte nesten in individuele kooien. Wanneer de nesten worden geboren (Part B) zullen de moederdieren tijdens doseren, wegen, observeren en bloedafname tijdelijk van hun pups worden gescheiden (maximaal 5 minuten per dier). Daarnaast zullen de pups voor identificatie, observeren en/of wegen van hun moeder en nestgenoten worden gescheiden (maximaal 5-10 minuten per nest). Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 2 – Hoofdstuk 2.A en de NTS.

7. Kunt u uitleggen wat u bedoelt met “Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation” (2.H), als er geen oppervlakkige pijn wordt verwacht en pijnbestrijding tegenstrijdig is met het experiment?

Antwoord:

In deze dose range finder (en op basis van dat dose level dus ook de main-) studie wordt inderdaad geen toxiciteit verwacht op basis van de literatuur die beschikbaar is. Mocht er echter om andere redenen ongerief ontstaan (bijvoorbeeld oppervlakkige wondjes door overmatig poetsgedrag van dominante kooigenoten), dan zou bijvoorbeeld een basiszalf verlichting kunnen geven. Om deze reden is bovenstaande zin opgenomen in de aanvraag. De methode omvat dus geen directe pijnbestrijding in de vorm van pijnstillende middelen. Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 1 en 2 – Hoofdstuk 2.H.

8. U geeft aan bij *Humane endpoints* (2.J) dat u het *OECD guidance document on humane end points* (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) volgt, maar volgens de DEC zijn de eindpunten daarin niet erg specifiek omschreven. Kunt u dit verduidelijken? Kunt u aangeven hoe u de humane eindpunten zo gaat toepassen dat ernstig ongerief zal worden vermeden?

Antwoord:

Zie ook de algemene uitleg over humane eindpunten in vraag 5.

De dieren worden 2 maal per dag gecontroleerd op terminatie conditie (moribundity)/mortaliteit. Daarnaast zullen de dieren dagelijks worden gedoseerd en worden gescoord op klinische symptomen, waardoor de dieren ook in de hand in detail worden bekeken. Weegmoment van lichaamsgewicht en voerconsumptie zullen minimaal 3x per 10 dagen worden uitgevoerd, waardoor afwijkingen hierin ook tijdig zullen worden opgemerkt. Er wordt gekeken naar de algehele conditie van het dier om te bepalen of de gezondheid van het dier het toe laat de proef te vervolgen. In het geval van ernstige klinische symptomen (bijvoorbeeld lethargie en ademhalingsproblemen) dan wel niet in combinatie met afname in lichaamsgewicht (>10% tussen 2 tijdstippen) en/of in combinatie met afname in voerconsumptie, zal het dier worden afgevoerd, voordat de situatie verslechtert. In geval van twijfel kan op elk moment de dierenarts worden geraadpleegd.

Bovenstaande tekst ook in Bijlage 1 – Hoofdstuk 2.J verwerkt en in Bijlage 2 – Hoofdstuk 2.J.

Bij bijlage 2:

9. Voor bijlage 2 gelden ook de vragen 5, 6, 7 en 8 zoals gesteld bij bijlage 1.

Antwoord:

Zie voor de antwoorden op de vragen 5-8 in Bijlage 2, de antwoorden op de vragen van Bijlage 1 bovenstaand.

10. Onder deel 2.A van het formulier schrijft u (bij studiedeel B) "blood sample collection on a maximum of six time points at the end of the post-coitum period to determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN". Kunt u uitleggen hoe u de *post coitum*-periode definieert, hoe vaak u bloedmonsters gaat afnemen bij het moederdier, waarom voor de bepaling van *maternal exposure levels* herhaalde bloedbemonstering noodzakelijk is, en waarom parameters voor *fetal exposure* niet worden meegenomen?

Antwoord:

Voor dit experiment zullen tijd-gepaarde dieren worden besteld. Deze dieren zullen binnenkomen op de dag ze positief zijn bevonden van paring (Dag 0 post-coitum) of 1 dag na positief bevonden zijn van paring (Dag 1 post-coitum). Dosereren zal starten op Dag 6 post-coitum en zal eindigen op Dag 20 post-coitum. Op Dag 21 post-coitum, een dag voor de gemiddelde natuurlijke werpdatum, zullen de dieren in Part A in sectie gaan. Daarmee is de post-coitum fase gedefinieerd van de dag van paren (Dag 0 post-coitum) tot en met de dag van sectie (Dag 21 post-coitum).

In Part A en B zal er op twee momenten van de post-coitum fase van alle drachtige dieren bloed worden afgenomen voor bepaling van de schildklierhormonen. Naast het feit dat de schildklierhormonen een natuurlijke daling laten zien tijdens de dracht, is het niet te verwachten dat er direct na start doseren op Dag 6 post-coitum een effect wordt gezien op de schildklierhormoonproductie. Door op twee momenten tijdens de post-coitum fase de schildklierhormoon waarden te bepalen, kan er tijdens de dracht worden bepaald aan welke niveaus schildklierhormoon de foetussen zullen worden blootgesteld en hoe het verloop zich verhoudt ten opzichte tot de controlegroep.

Naast de bloedafname voor de bepaling van de schildklierhormonen, zal er op Dag 20 (een dag voor sectie) op 6

verschillende tijdstippen (3 dieren/tijdstip) bloed afgenomen voor de bepaling van een toxicokinetisch profiel van PCN in het bloed van de moederdieren, zodat informatie wordt verzameld hoe de blootstelling aan PCN gedurende 24 uur na doseren verloopt.

In totaal zal er dus op drie momenten bloed af worden genomen voor alle moederdieren tijdens de post-coitum fase. Op de eerste twee momenten is dit een eenmalige bloedafname, op het derde moment zal dit een herhaalde bloedafname zijn voor toxicokinetische evaluatie (6 tijdstippen, 3 dieren per tijdstip, resulterend in 3 bloedafnames per dier).

In Part B zal er daarnaast op postnatale dag (PND) 4 (het cullen van de nesten) en PND 21 (het eindpunt van de studie) bloed afgenomen voor de bepaling van schildklierhormonen van de pups. Van de moederdieren zal er op PND 21 ook eenmalig bloed worden afgenomen voor de bepaling van schildklierhormonen.

Foetale blootstelling aan PCN is niet opgenomen in de huidige aanvraag. Waar mogelijk, wordt deze analyse wel uitgevoerd. Echter door het gelimiteerde bloedvolume wat van de foetussen verkregen kan worden, is het bloed in eerste instantie geprioriteerd voor de bepaling van schildklierhormonen (de belangrijkste uitlees parameter van deze studie).

11. Bij Refinement (2.D) benoemt u dat ook *sample size* bijdraagt aan de vermindering, maar de DEC acht dit niet waarschijnlijk gezien de opzet met een "benchmark dose (BMD)" (2.A). Kunt u dit beargumenteren?

Antwoord:

Hartelijk dank voor uw opmerkzaamheid, het is inderdaad correct dat *sample size* in deze studie niet bijdraagt aan "refinement" en hierdoor ten onrechte in de tekst is beland. We hebben dit daarom ook verwijderd uit Hoofdstuk 2.D, daar de *sample size* reeds vooraf vast staat door de benchmark dose (BMD) approach die wij in deze studie opzet hebben gekozen.

NTS

12. De titel is erg lang en bovendien onbegrijpelijk voor leken. Zou u willen zorgen voor een lekentitel? -

Antwoord:

Titel aangepast in de niet-technische samenvatting en in project aanvraag 1.1.

13. Kunt u de NTS en de andere documenten beter op elkaar afstemmen, met name in het licht van vraag 1 hierboven?

Antwoord:

De NTS en de andere documenten zijn grondig nagelopen en waar nodig aangepast om de uniformiteit te waarborgen.

14. Het aantal dieren (3.3) is door allerlei opsplitsingen niet te volgen voor een leek. Ook hoort de term "ca." hier niet thuis. U kunt deze vraag beantwoorden met de diersoort en de maximale aantallen voor het hele project.

Antwoord:

Totaal aantal dieren genoteerd, opsplitsing verwijderd. Zie paragraaf 3.3, pagina 2

15. U schrijft bij 3.4 "Daarnaast kunnen negatieve gevolgen worden ondervonden door eventuele (tijdelijke) wijze van huisvesting." Kunt u dit toelichten in overeenstemming uw antwoord op vraag 6 hierboven?

Antwoord:

Korte toevoeging aan Bijlage NTS – Hoofdstuk 3.4 in overeenstemming met het antwoord op vraag 6.

16. Corrigeer spelfouten, zoals in samenstellingen die in het Engels los, maar in het Nederlands aan elkaar worden geschreven, bijv. "schildklierhormoonproductie", of draai dergelijke constructies om: productie van schildklierhormoon. Dit verhoogt de begrijpelijkheid voor de leek.

Antwoord:

NTS is grondig nagelopen op de aanwezigheid van spelfouten of onduidelijkheden voor de leek.

Vragenronde 2

Algemene opmerking bij de NTS:

De DEC wil u erop attenderen dat u in de NTS als partner het 5.1 lid 1c noemt, wat gezien de openbare publicatie van de NTS misschien niet uw bedoeling is. Het staat u uiteraard vrij die keuze zelf te maken.

Antwoord: Dit is inderdaad verwijderd en verwijst nu naar een samenwerking met een Nederlands ziekenhuis. (zie ook NTS)

Vragen:

1. Kunt u helder maken waarom stoffen die direct op de schildklier werken niet relevant zijn voor onderzoek naar T4-levels en IQ?

Antwoord:

De vraagstelling richt zich op effecten op de schildklier via levermetabolisme. Als we een stof zouden kiezen die (ook) direct op de schildklier effect heeft, kunnen we niet onderscheiden of downstream effecten veroorzaakt zijn via effecten op de lever of (ook) direct via de schildklier. Daarmee zouden we onze vraagstelling specifiek gericht op de consequenties van lever-gemedieerde schildkliereffecten niet kunnen beantwoorden. De keuze voor een stof die niet direct op de schildklier werkt maar wel op de lever is dus essentieel (zie ook onderstaand antwoord op vraag 2).

2. U geeft aan dat u een stof hebt gekozen die specifiek via de lever een effect veroorzaakt op schildklierhormoon-levels (indirect mechanisme). Met de beschrijving wordt de impressie gewekt dat deze stof geselecteerd is op een CAR/PXR/UGT-lever/thyroid-werkingsmechanisme. Kunt u aangeven hoe deze (kinetische) lever en thyroid-parameters kwalitatief en kwantitatief vertaald kunnen worden van de rat naar de mens? Wanneer deze mechanismen niet één op één vertaalbaar zijn van rat naar mens, kunt u dan uitleggen hoe u toch tot transleerbaarheid naar de mens komt, en waarom specifiek dit indirecte werkingsmechanisme is geselecteerd (zie ook vraag 1)? Als het werkingsmechanisme van de geselecteerde stof anders is, kunt u dan uitleggen welk mechanisme dit betreft en hoe de te meten parameters kwalitatief en kwantitatief vertaalbaar zijn naar de beschikbare gegevens in de mens?

Antwoord:

De aanname van vertaalbaarheid naar de mens wordt gemaakt in de huidige toepassing van de regelgeving over stoffen met lever-gemedieerde schildkliereffecten. Er is een trend waarneembaar dat elk levereffect onafhankelijk van consequenties daarvan gezien in een dierstudie door risicobeoordelaars wordt geïnterpreteerd als een hormoonverstoring, mogelijk leidend tot kwalificatie van de stof als hormoonverstoorder. Daarbij is de specifieke discussie ontstaan of levereffecten op zich als hormoonverstoring moeten worden gezien. Dat leidt tot de directe vraag hoe de lijn van lever naar schildklier naar downstream effecten loopt in de dierstudie, zowel qua mechanisme als in termen van dosis-respons relatie. De relevantie daarvan voor de mens wordt daarbij impliciet aangenomen. Dat is dan ook het uitgangspunt voor deze studie. De studie is bedoeld als een landmarkstudie waarmee eens en voor al helder zal worden hoe de levermetabolisme-schildklieras werkt in de dierstudie en heeft dus belangrijke implicaties voor de risicoschatting van stoffen.

3. Zal in de tweede fase van het overkoepelende project (niet beschreven in deze aanvraag) bekeken worden hoe de MIE en KE zich verhouden tot de *ultimate adverse outcome*? Deze is in de humane situatie beschreven (verlaagd IQ in de nakomelingen), maar is nog niet gedefinieerd in diermodellen. Heeft u ook bepaalde neuromarkers voor ogen waarmee de embryonale ontwikkeling van bepaalde, bij cognitie betrokken, hersengebieden gevolgd kan worden?

Antwoord:

Het korte antwoord op het eerste deel van deze vraag is ja. Een vervolgproject is voorzien waarin de downstream effecten in detail worden bestudeerd, met name effecten op het brein, waarvoor in de huidige proef weefsels verzameld zullen worden zoals aangegeven. Details daarvan zullen nog uitgewerkt worden, maar een uiterst gedetailleerde studie wordt voorzien. Deze tweestaps-procedure wordt gevolgd op aangeven van de subsidieverstrekker.

4. Gerelateerd hieraan: kunt u toelichten waarom u kiest voor de strategie om eerst op zoek te gaan naar moleculaire veranderingen en daarna pas na te gaan of in het model de uiteindelijke uitkomst ook gemeten kan worden in dit diermodel (verlaagd IQ), terwijl u aangeeft dat dit een uitdaging kan zijn ("dit is niet eenvoudig te testen in foetussen en pups van de rat")? Wij begrijpen niet waarom u niet eerst wilt zien of de transleerbaarheid van het model gerealiseerd kan worden, waarna vervolgens op moleculair/cellulair niveau gezocht kan worden naar het mechanisme. Hiermee lijkt een deel van het doel van dit project niet realiseerbaar binnen de

experimenten van dit project (3.2 doel). Zie 3.2: "This project aims at monitoring relevant maternal and offspring liver and thyroid parameters after prenatal exposure to the liver enzyme inducer pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) using Benchmark Dose (BMD) modelling in order to define quantitative relationships between the first three key events in the Adverse Outcome Pathway (AOP). Moreover, an extensive collection of tissues from the study will be stored for analysis, providing the opportunity for relating in-life results to adverse outcome parameters." Het wordt met deze studie niet duidelijk welke verschillen op moleculair en cellulair niveau relevant zijn. Dit omdat ze niet in dit project aan elkaar gerelateerd lijken te kunnen worden.

Antwoord:

De fasering van het project is van tevoren bepaald door de subsidiegever. Deze fasering is echter niet onlogisch, aangezien a priori vanuit de vraagstelling duidelijk is dat de lever en de schildklier de organen zijn die in detail onderzocht dienen te worden. De eerste stappen in de AOP zullen in lever en vervolgens schildklier optreden, en het zijn deze organen die we in hoge mate van detail volgen in deze studie. De parameters die normaliter in de regulatoire tox studies worden bepaald vinden we ook terug in deze proefopzet, die bovendien is aangevuld met additionele parameters, met name die waarmee effecten op levermetabolisme en schildklierhomeostase in zoveel mogelijk detail worden gemonitord. Daarmee leggen we de breedst mogelijke basis voor vervolgvergelijking met de adverse effecten die we in deel twee van deze studie zullen onderzoeken. Daarmee zullen we naar verwachting ook een (zoveel mogelijk kwantitatieve) AOP kunnen beschrijven. Dat maakt vervolgens mogelijk de vraag te beantwoorden hoe levereffecten beoordeeld moeten worden in relatie tot secundaire effecten op de schildklier en de beoordeling van stoffen als hormoonverstoorder.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De aanvraag betreft een wetenschappelijk onderzoek naar de effecten van prenatale blootstelling aan een modelstof op lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit. Het onderzoek beoogt de belangrijkste mechanismen van de lever-schildklier-as te kunnen duiden. Het onderzoek speelt zich af tegen de achtergrond van regulatorisch onderzoek (OECD) naar *endocrine disruptive* effecten van xenobiotica en veiligheidsrisico's voor mens, dier en milieu. De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over de aanpak van de onderzoekers, met name m.b.t. het lever-gemedieerde effect op de ontwikkeling, en daar veel vragen over gesteld aan de onderzoekers. Na de beantwoording van de vragen is de commissie van oordeel dat de aanvraag adequaat en relevant is opgesteld en aangepast. Het project bestaat uit twee delen: een *dose finding*-studie en de uiteindelijke studie, die een logische samenhang tot elkaar hebben. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking definitie project.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het vinden van de belangrijkste mechanismen waarlangs blootstelling aan de gekozen modelstof PCN tijdens de zwangerschap bij moederdieren en neonaten lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit veroorzaakt. Het indirecte doel betreft het verkrijgen van nieuwe wetenschappelijke inzichten rondom de vraag of, en zo ja via welke mechanismen, levertoxische stoffen de ontwikkeling van nageslacht zouden kunnen verstoren. Dit is van belang omdat bekend is dat vermindering van schildklierhormoon tijdens de zwangerschap bij de mens o.m. de hersenontwikkeling beïnvloedt en kan leiden tot IQ-verlies. Hoewel nog onduidelijk is welke biomarkers voor verstoorde hersenontwikkeling bij de rat in vervolgonderzoek gebruikt gaan worden, is de DEC van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld voor richtlijn-gedreven onderzoek en de maatschappelijke behoefte naar veilige producten.
5. De belangrijkste belanghebbenden en de morele waarden in dit onderzoeksproject zijn:
Onderzoeker: verdieping van wetenschappelijke kennis, verhoging van wetenschappelijke statuus;
Bedrijf: legitimiteit van onderzoek aan lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit; economische waarden
Samenleving: vergroting van kennis voor inschatting van veiligheidsrisico's;
Proefdieren: de aantasting van hun integriteit en welzijn.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep is zeer deskundig en ervaren met richtlijn-gedreven onderzoek op het gebied van (o.a.) ontwikkelings- en voortplantingstoxicologie. De groep heeft sinds de update van de OECD TG 421 en 422 met schildklierhormoonmetingen (2014), meer dan 100 van dergelijke studies uitgevoerd. De onderzoeksgroep is voor het voorliggende wetenschappelijke onderzoeksproject samenwerkingen aangegaan met experts van het 5.1.1d2f (schildklierparameters bij knaagdieren), 5.1.1d2f (fase II-essays) en 5.1.1d2f (BMD-analyses, AOP). Daarmee is naar het oordeel van de DEC de kennis en kunde goed gewaarborgd.
8. Het project is goed en gefaseerd opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Nadat de vragen van de DEC zijn beantwoord en de aanvraag is aangepast, kan de DEC zich vinden in het voorgestelde onderzoek (zie ook vragen en antwoorden en dilemma's). Een eerste essentiële stap is het kiezen van een stof die model kan staan voor xenobiotica die aangrijpen op de lever zonder directe effecten op de schildklier-as en op de ontwikkeling van hersenen. De keuze voor pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) wordt goed onderbouwd (3.2). De keuze voor de hoogste dosis wordt bepaald door literatuurgegevens over acute effecten van PCN op schildkliermetabolisme. In het kader van het voorliggende ontwikkelingsonderzoek worden dieren gedurende 14 dagen blootgesteld aan de stof. Als eerste stap wordt in een beperkte dose-finding studie uitgezocht wat de maximaal getolereerde dosis wordt voor de hoofdstudie. Uitkomstparameters (lichaamsgewicht, voedselconsumptie, klinische

symptomen) zijn onderbouwd en relevant. Voor de hoofdstudie worden groepen van drachtige dieren gedurende 14 dagen (4-20 dagen postcoitum) blootgesteld aan verschillende doseringen PCN. Bloed en weefselmonsters worden verzameld op PC 21, of 21 dagen postnataal, voor de bepaling van tal van lever- en schildklierparameters. De uitkomstparameters worden door de DEC als relevant beoordeeld en kunnen inzicht geven in de belangrijkste lever mechanismen die bijdragen tot verstoorde schildklierfunctie van deze stof.

De DEC heeft uitgebreid stilgestaan bij de generaliseerbaarheid van de bevindingen naar andere levertoxische stoffen, en acht dit een relevante eerste stap. Een belangrijke vraag was waarom alleen wordt gekeken naar een door de lever gemedieerd effect, terwijl schildklierhormoon-*levels* ook door andere, direct op de schildklier aangrijpende, stoffen kunnen worden beïnvloed. Daarnaast zijn er discussies geweest over de transleerbaarheid van het beschreven levermechanisme/aangrijpingspunt van de geselecteerde stof naar de mens.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU-richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU-richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn. De drachtige moederdieren worden solitair gehuisvest, de onderzoekers hebben voldoende gemotiveerd waarom dit noodzakelijk is.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief van de dieren bestaat uit 1x daags oraal doseren van PCN door ervaren medewerkers, ten hoogste 1x bloedafname (onder anesthesie), en euthanasie. Ongewenste stoffeffecten worden in de hoofdstudie vermeden maar zijn niet uitgesloten in de *dose finding*-studie. De drachtige ratten worden solitair gehuisvest, hetgeen wordt onderbouwd. Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als ten hoogste matig. De DEC acht dit realistisch.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast. Er wordt door toediening van de teststof en bloedbemonstering inbreuk gedaan op de fysieke integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Er worden in principe op grond van de kennis van de toe te dienen stof geen humane eindpunten verwacht, maar desondanks zijn algemene criteria voor het toepassen van humane eindpunten goed beschreven.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De aard van de vraagstelling heeft te maken met inschatting van veiligheidsrisico's m.b.t. ontwikkeling en voortplanting voor mens en dier. Omdat hier een grote diversiteit van organen en processen bij betrokken is, betoogt de indiener dat onderzoek met intacte dieren onvermijdelijk is. De DEC acht die redenering navolgbaar. De onderzoeker onderbouwt de keuze verder met het argument dat het project uitgevoerd wordt tegen de achtergrond van OECD-richtlijnen waarin gezocht wordt naar benaderingen om mechanismen van mogelijke *endocrine disruptive* effecten van stoffen op te sporen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het projectvoorstel kent twee onderdelen. Deel 1, de *dose finding*-studie, wordt uitgevoerd met 12 dieren. Dit lijkt de DEC een realistische inschatting. De hoofdstudie wordt uitgevoerd met groeps-grootte en aantallen groepen die bepaald worden door de *bench mark dose* (BMD)-analysemethode, waarvan de voordelen boven de klassieke NOAEL/LAEL-benaderingen door de aanvrager overtuigend worden onderbouwd.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Het project bevat een *dose finding*-studie om belastende effecten van blootstelling aan stofconcentraties in de hoofdstudie te vermijden. De rat wordt als proefdier gekozen mede omdat hiermee veel ervaring bestaat in vergelijkbare studies. Kooiverrijking is aanwezig en dieren worden meermaals daags gemonitord tijdens de studie.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 1 en 2 alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden. Het gaat in deze studie om effecten van stoffen op voortplanting en ontwikkeling. Daarom is gekozen voor blootstelling van vrouwelijke (drachtige) dieren tijdens de zwangerschap aan de teststof. Metingen aan nakomelingen (foetus of 21 dagen oude dieren) worden uitgevoerd aan beide geslachten. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke (drachtige) dieren uit te voeren, maar van de nakomelingen worden wel beide geslachten gebruikt.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Dieren worden gedood in het kader van de proef voor het verzamelen van organen en bloed en behoefte van de bepaling van aan de lever- en schildklierhormoon-activiteit gerelateerde parameters en histopathologie. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. Dit is bereikt na kritische vragen hierover van de DEC.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk onderzoek naar de lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit na prenatale blootstelling van ratten aan een lichaamsvreemde stof, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van 2.112 ratten met maximaal matig ongerief rechtvaardigt. De aanvrager willen de mechanismen achter de verstoorde productie van schildklierhormonen door xenobiotica (aan de hand van een door hen gekozen modelstof) in kaart brengen. Daarbij wordt de rol van de lever in dit proces onderzocht, en wordt tevens gekeken welke gevolgen het effect van lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit op de schildklierparameters van het embryo, de foetus en de pup heeft. De DEC is van mening dat directe vergelijking tussen het mechanisme en het niet gemeten eindpunt (IQ-verlies) inzicht zal geven in veranderingen die al dan niet direct vertaalbaar en relevant zijn voor de mens, en die op zichzelf informatie zullen geven over de lever-schildklier-as in een veelgebruikt en wettelijk gedreven gebruikt modeldier in toxiciteitsstudies.
2. Er vindt een aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met maximaal matig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, zal dit project ertoe bijdragen dat de belangrijkste mechanismen van de lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit in moederdieren en neonaten in kaart wordt gebracht, hetgeen van belang is voor het in de toekomst opstellen van *adverse outcome pathways* die een rol zouden kunnen spelen bij verstoorde hersenontwikkeling. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk. De onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het onderzoek naar de lever-gemedieerde schildkliertoxiciteit na prenatale blootstelling aan een lichaamsvreemde stof in de rat een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. De DEC heeft deze adviesaanvraag ervaren als een zeer complex dossier dat veel discussie heeft gevegd. De belangrijkste punten van discussie waren de volgende. De onderzoekers willen een kwantitatieve AOP vaststellen voor een lever-thyroid-gemedieerd (mogelijk) niet gemeten eindpunt IQ-verlies. Als men dit onderzoekt en men selecteert een specifieke stof die op een specifieke manier op de lever aangrijpt, dan mag worden verwacht dat zij een antwoord hebben op de vraag waar de stof precies op aangrijpt en waarom men alleen indirecte effecten op de schildklier wil onderzoeken. De vraag over de directe/indirecte werking op de schildklier is uitgelegd. De vraag wat betreft aangrijpingspunt op de lever mist een expliciet antwoord. De uitspraak van de onderzoekers dat deze studie voor eens en voor altijd helder maakt hoe de levermetabolisme-schildklier-as werkt, wordt niet door alle DEC-leden gedeeld, omdat er meerdere aangrijpingspunten mogelijk lijken te zijn en de uitspraak te algemeen is. De DEC is echter wel van mening dat deze studie opheldering kan geven wat betreft stoffen met een overeenkomstig werkingsmechanisme als de modelstof PCN en dat de resultaten gebruikt kunnen worden voor een kwantitatieve AOP voor genoemde stofgroep. Op grond daarvan is de DEC unaniem wat betreft het belang van het onderzoek en daarmee wat betreft het positieve advies.

Project proposal:

1. In de inleiding schrijft u "To develop an adverse outcome pathway (AOP) for the effect of increased maternal TH metabolism on fetal and neonatal brain development, quantitative relationships have to be determined between the molecular initiating event (MIE), the subsequent key events (KE), and the ultimate adverse outcome, and will be the aim of this multi-stakeholder project." De DEC heeft echter moeite te begrijpen hoe u de MIE, KE en *ultimate adverse outcome* kunt relateren aan de beschreven parameters. Kunt u deze begrippen en hun kwantitatieve relaties toelichten in samenhang tot dit project? In de bijlage wordt immers beschreven dat u thyroïdehormoon-*levels* gaat bepalen in moederdier en nakomelingen, en leverparameters in moederdieren. Er wordt niet uitgelegd hoe deze kwantitatief gerelateerd kunnen worden aan de vermelde *adverse outcome*.

Antwoord:

Ten eerste moeten wij verduidelijken dat het overkoepelende project bestaat uit meerdere delen, die gefaseerd zullen worden uitgevoerd. De eerste fase van het project zal bestaan uit het uitvoeren van de dierproef zoals beschreven in de aanvraag. Tijdens deze dierproef zal worden gekeken naar het effect van PCN op de lever, wat in theorie de waarden van de schildklierhormonen in de moederdieren zal beïnvloeden. Door tijdens deze studie materiaal (bloed en weefsels [thyroid en hersenen]) te verzamelen van zowel het moederdier, de ongeboren foetussen en de geboren pups in verschillende levensstadia, wordt het mogelijk om te zien welke veranderingen er op bijv. cellulair en mRNA niveau plaatsvinden die vervolgens gerelateerd kunnen worden aan de veranderingen gezien in de hormoonwaarden in het bloed. Deze fase zal dus voornamelijk naar de "molecular initiating events (MIE)" en "key events (KE)" kijken. Wanneer duidelijk is wat er gebeurt op cellulair en moleculair niveau in de rat en hoe deze cascade in relatie staat tot verschillende dose-levels (Benchmark approach), zal in de tweede fase van het overkoepelende project (niet beschreven in deze aanvraag) bekeken worden hoe de MIE en KE zich verhouden tot de "ultimate adverse outcome". Deze adverse outcome is in de humane situatie beschreven (verlaagd IQ in de nakomelingen), maar is nog niet gedefinieerd in diermodellen. Dit terwijl diermodellen wel veelvuldig (en volgens de wetgeving) gebruikt worden voor humane risicoschatting. Het tweede deel van het overkoepelende project zal dan ook ingaan op de adverse outcome in de rat (bijvoorbeeld morfologische veranderingen in hersencoupees van weefsel verzameld in fase 1) maar ook een link leggen naar de humane situatie door een samenwerking met het 5.1 lid1c, waardoor de mogelijkheid bestaat om ook op humaan niveau te kunnen bepalen hoe bepaalde toe- of afnames in schildklierhormoon die worden gevonden in diermodellen, zich verhouden met wat er in de mens gebeurt. Zie ook de aanpassingen in de verschillende documenten (voorzien van comments en formatting).

2. Op basis waarvan verwacht u dat de gevonden kwantitatieve relaties transleerbaar zullen zijn naar de mens?

Antwoord:

Het is reeds bekend dat schildklierhormonen cruciaal zijn voor o.a. de ontwikkeling van de hersenen van de foetus en pasgeborene. In de literatuur staat beschreven (op basis van humane data) dat lage maternale T4 levels tijdens de zwangerschap worden gerelateerd aan een lager IQ in de nakomelingen (zie ook background, eerste alinea).

Uitgangspunt van dit project is dus dat er een probleem/risico is voor de mens, voor welke een risicoschatting in dierstudies lastig blijkt. Bovenstaande data is namelijk mede aanleiding geweest om aan richtlijn dierstudies schildklierhormoonbepalingen toe te voegen voor de humane risicoschatting op hormoon-verstorende eigenschappen van een stof. Hierdoor weten we ook dat er chemicaliën zijn die in de rat, via de lever, zorgen voor lage schildklierhormoon levels tijdens de dracht (het tweede uitgangspunt in onze studie). Echter ontbreekt er op dit moment een goede parameter om, vanuit het bepalen van de schildklierhormonen in bloed in een rattenstudie, het risico voor de (ongeboren) mens te kunnen evalueren.

De verlaging van T4 in de mens resulteert namelijk in een verlaging van het IQ in de nakomelingen maar dit is niet

eenvoudig te testen in foetussen en pups van de rat (en bovendien worden dergelijke eindpunten binnen deze richtlijn studies niet onderzocht). Met het overkoepelende project willen we daarom achterhalen welke uitkomst, meetbaar in de studies uitgevoerd in de rat, relevant is voor de risico's voor humane nakomelingen.

3. Op grond van welke informatie komt u tot de conclusie dat de stof niet direct aangrijpt op de hersenen van de ontwikkelende pups en evenmin op het thyroïde-systeem (3.2)? Welke aanwijzingen hebt u dat deze stof effecten heeft op de neurologische ontwikkeling van de pup, en als deze er niet zijn, waarom is er dan voor deze modelstof gekozen als in de inleiding wordt aangegeven dat u zich richt op neonatale hersenontwikkeling?

Antwoord:

De reden om voor PCN als modelstof te kiezen is dat deze (op basis van uitgebreide literatuur data) aangrijpt op de lever en hierdoor de schildklierhormoonconcentraties verlaagt. PCN induceert phase II lever enzymen in de volwassen rat en verhoogt de expressie van bepaalde leverenzymen (bijvoorbeeld UGT1A isozymen) en verhoogt op die manier de glucuronidatie van T4. Dit leidt tot verlaagde serum T4 concentraties en (ter compensatie) verhoogde TSH concentraties. Daarnaast is bekend vanuit de literatuur dat PCN niet direct aangrijpt op de schildklier, wat het mogelijk maakt om de lever-schildklier interactie in dit project te bestuderen. In de literatuur zijn vele andere stoffen, zoals phenobarbital en dioxine, gebruikt om de effecten op de lever en schildklier te bestuderen, maar door de directe interactie met de schildklier zijn deze stoffen niet geschikt voor dit project. Zoals ook beschreven bij vraag 1 is het juist de ontbrekende link tussen wat wordt gezien in de mens (laag T4 tijdens de zwangerschap, verlaagd IQ in nakomelingen) en wat gemeten wordt in de rat (veranderde T4 levels via de lever na blootstelling aan bepaalde stoffen) die wij in het overkoepelende project willen leggen. In fase 1 (deze dierproef) is het daarom van belang de cellulaire en moleculaire events die leiden tot de verlaagde T4 levels te definiëren, zodat we in een volgende fase van het project de link kunnen leggen naar adverse events in rat nakomelingen (en hoe deze vertaalbaar zijn naar de IQ-effecten in de mens, zie vraag 1 en 2). Het zou daarom ongewenst zijn een modelstof te kiezen die direct aangrijpt op de neonatale hersenontwikkeling. Zo ver uit de beschikbare literatuur bekend is, gebeurt dit niet bij PCN.

Bijlage 1:

4. Onder A schrijft u: "The aim of the dose range finder study is to determine whether rats tolerate the highest dose level (based on available literature) for the main study." Wat is uw operationele definitie van *tolerated dose* in termen van *dose level* en effecten/ongerief. Hoe verhoudt die zich tot de beschreven experimenten in bijlage 2, waarin immers effecten op de nakomelingen worden onderzocht?

Antwoord:

Een *tolerated dose* definiëren wij als het *dose level* waarop het dier een normaal lichaamsgewicht (stoename) en voedingspatroon vertoont en waarbij geen relevante klinische symptomen (lethargie, ongecoördineerde bewegingen, buikligging, etc.) worden waargenomen. Een getolereerde dosis is essentieel om een succesvolle dracht mogelijk te maken en vervolgens tot voldoende nakomelingen te komen.

Tot nu toe is in de literatuur voornamelijk onderzoek gedaan met PCN met mannelijke ratten (vandaar onze *dose range finder* in vrouwtjes), waarbij maximaal tot 200 mg/kg/dag (oraal) of 2000 ppm (dieet) is gedoseerd. In deze studies zijn geen effecten gerapporteerd op voerconsumptie, lichaamsgewicht of klinische symptomen. Echter zijn de meeste studies uitgevoerd bij lagere concentraties en veelal voor kortere blootstellingsperiodes, waardoor we niet weten of hogere *dose levels* (bv. 300 mg/kg/dag) getolereerd worden door de rat bij herhaalde blootstelling. Deze *dose range finder* zal als basis dienen voor de *dose levels* die worden geselecteerd voor de hoofdstudie. Het effect op de lever (inductie van Phase II enzymen) wordt al bij lagere concentraties verwacht, op basis van de (beperkt) beschikbare literatuur in drachtige dieren, echter is een brede *dose range* gewenst om een zo optimaal mogelijke *dose-response curve* te kunnen maken voor de uiteenliggende parameters die in deze dierstudie onderzocht worden.

5. Kunt u aangeven wat u verwacht als *adverse effects* en hoe die verwachting zich verhoudt tot de humane eindpunten in deze bijlage?

Antwoord

Algemeen: De humane eindpunten worden gehanteerd volgens het OECD guidance document, die verder gespecificeerd zijn in Business Operating Procedures van 5.1 lid2h, waar de dierproef uitgevoerd zal worden. Een humaan eindpunt wordt hierin beschreven als de eerste indicatie in een dierexperiment van potentiële pijn en/of ongerief die, binnen de context van de te behalen wetenschappelijke eindpunten gebruikt kan worden voor het ondernemen van acties, zoals vaker observeren of het humaan doden van het dier. Deze humane eindpunten zijn niet noodzakelijkerwijs gebaseerd op klinische symptomen, maar kunnen ook worden gebaseerd op fysiologische observaties die voorspellend zijn voor nog komend ongerief. Hieronder is o.a. gedefinieerd: het langdurig of definitief niet eten of drinken, snel en continu gewichtsverlies (>10% tussen 2 meetpunten), abnormaal uiterlijk over langere periode, ademhalingsproblemen, waarneembare bloeding en/of verstoorde mobiliteit. Zie ook toevoegingen in Bijlage 1 en Bijlage 2 – hoofdstukken 2.D Refinement en 2.J Humane endpoints (Punt 8 –vragen aan de onderzoeker).

Dose Range finder – Bijlage 1: Data uit de literatuur laat zien dat er bij 200 mg/kg/dag (7 dagen blootstelling) normale lichaamsgewichten en normale voerconsumptie worden geobserveerd en dat er geen toxicologisch relevante klinische symptomen zijn. Wel worden er effecten in (het gewicht van) de lever en/of schildklier gezien. In de dose range finder, waar we 10 dagen lang de dieren blootstellen aan concentraties boven deze 200 mg/kg/dag, verwachten we op basis van de beschikbare literatuur geen toxiciteit. Mochten de dieren tijdens de dose range finder verlies in lichaamsgewicht vertonen, al dan niet in combinatie met een sterk afgenomen voerconsumptie, en/of in combinatie met relevante klinische symptomen, zal de dosering naar beneden aangepast worden of zullen de dieren op een humane manier worden gedood (zie ook bovenstaande – algemeen humane eindpunten).

Hoofdstudie – Bijlage 2: De hoogste dosering van de hoofdstudie wordt gekozen op basis van de afwezigheid van adverse effecten op lichaamsgewicht, voerconsumptie en relevante klinische symptomen in de dose range finder. Hierdoor worden er op deze parameters geen adverse effecten verwacht in de hoofdstudie.

Wel is, zoals ook hierboven is beschreven, bekend dat PCN ook op lage doseringen, effect heeft op (het gewicht van) de lever en/of schildklier, waardoor de onderzoeksvraag beantwoord kan worden.

Als toevoeging op de punten beschreven onder punt Algemeen van dit antwoord zullen dieren die vroegtijdig werpen, dieren die moeite hebben met werpen en dieren die niet voor het nest zorgen (bijv. koude pups, pups verspreid door de kooi en/of het niet voeden van pups) worden afgevoerd, al dan niet met het bijbehorende nest.

6. Kunt u uitleggen wat u bedoelt met “short term separation” (2.A) en aangeven wat de maximale duur van deze afzondering zal zijn, daar dit als ongerief opgevat zou kunnen worden?

Antwoord:

De dieren zullen tijdens de dose range finder gezamenlijk (3 vrouwen per doseergroep) gehuisvest worden. Tijdens het doseren, wegen en observeren, zullen de dieren uit de kooi genomen worden en zullen hierdoor tijdelijk (maximaal 5 minuten per dier) afgezonderd zijn van hun kooigenoten. Nadat de handelingen zijn uitgevoerd, zullen de dieren altijd direct worden teruggeplaatst bij hun kooigenoten. Hierdoor is het ongerief zeer gering. Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 1 – Hoofdstuk 2.A en de NTS.

Tijdens de hoofdstudie zitten de dieren vanwege hun dracht en verwachte nesten in individuele kooien. Wanneer de nesten worden geboren (Part B) zullen de moederdieren tijdens doseren, wegen, observeren en bloedafname tijdelijk van hun pups worden gescheiden (maximaal 5 minuten per dier). Daarnaast zullen de pups voor identificatie, observeren en/of wegen van hun moeder en nestgenoten worden gescheiden (maximaal 5-10 minuten per nest). Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 2 – Hoofdstuk 2.A en de NTS.

7. Kunt u uitleggen wat u bedoelt met “Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation” (2.H), als er geen oppervlakkige pijn wordt verwacht en pijnbestrijding tegenstrijdig is met het experiment?

Antwoord:

In deze dose range finder (en op basis van dat dose level dus ook de main-) studie wordt inderdaad geen toxiciteit verwacht op basis van de literatuur die beschikbaar is. Mocht er echter om andere redenen ongerief ontstaan (bijvoorbeeld oppervlakkige wondjes door overmatig poetsgedrag van dominante kooigenoten), dan zou

bijvoorbeeld een basiszalf verlichting kunnen geven. Om deze reden is bovenstaande zin opgenomen in de aanvraag. De methode omvat dus geen directe pijnbestrijding in de vorm van pijnstillende middelen. Zie ook toevoeging in tekst Bijlage 1 en 2 – Hoofdstuk 2.H.

8. U geeft aan bij *Humane endpoints* (2.J) dat u het *OECD guidance document on humane end points* (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) volgt, maar volgens de DEC zijn de eindpunten daarin niet erg specifiek omschreven. Kunt u dit verduidelijken? Kunt u aangeven hoe u de humane eindpunten zo gaat toepassen dat ernstig ongerief zal worden vermeden?

Antwoord:

Zie ook de algemene uitleg over humane eindpunten in vraag 5.

De dieren worden 2 maal per dag gecontroleerd op terminatie conditie (moribundity)/mortaliteit. Daarnaast zullen de dieren dagelijks worden gedoseerd en worden gescoord op klinische symptomen, waardoor de dieren ook in de hand in detail worden bekeken. Weegmoment van lichaamsgewicht en voerconsumptie zullen minimaal 3x per 10 dagen worden uitgevoerd, waardoor afwijkingen hierin ook tijdig zullen worden opgemerkt. Er wordt gekeken naar de algehele conditie van het dier om te bepalen of de gezondheid van het dier het toe laat de proef te vervolgen. In het geval van ernstige klinische symptomen (bijvoorbeeld lethargie en ademhalingsproblemen) dan wel niet in combinatie met afname in lichaamsgewicht (>10% tussen 2 tijdstippen) en/of in combinatie met afname in voerconsumptie, zal het dier worden afgevoerd, voordat de situatie verslechtert. In geval van twijfel kan op elk moment de dierenarts worden geraadpleegd.

Bovenstaande tekst ook in Bijlage 1 – Hoofdstuk 2.J verwerkt en in Bijlage 2 – Hoofdstuk 2.J.

Bijlage 2:

9. Voor bijlage 2 gelden ook de vragen 5, 6, 7 en 8 zoals gesteld bij bijlage 1.

Antwoord:

Zie voor de antwoorden op de vragen 5-8 in Bijlage 2, de antwoorden op de vragen van Bijlage 1 bovenstaand.

10. Onder deel 2.A van het formulier schrijft u (bij studiedeel B) "blood sample collection on a maximum of six time points at the end of the post-coitum period to determine the internal, maternal exposure levels to the chemical PCN". Kunt u uitleggen hoe u de *post coitum*-periode definieert, hoe vaak u bloedmonsters gaat afnemen bij het moederdier, waarom voor de bepaling van *maternal exposure levels* herhaalde bloedbemonstering noodzakelijk is, en waarom parameters voor *fetal exposure* niet worden meegenomen?

Antwoord:

Voor dit experiment zullen tijd-gepaarde dieren worden besteld. Deze dieren zullen binnenkomen op de dag ze positief zijn bevonden van paring (Dag 0 post-coitum) of 1 dag na positief bevonden zijn van paring (Dag 1 post-coitum). Dosereren zal starten op Dag 6 post-coitum en zal eindigen op Dag 20 post-coitum. Op Dag 21 post-coitum, een dag voor de gemiddelde natuurlijke werpdatum, zullen de dieren in Part A in sectie gaan. Daarmee is de post-coitum fase gedefinieerd van de dag van paren (Dag 0 post-coitum) tot en met de dag van sectie (Dag 21 post-coitum).

In Part A en B zal er op twee momenten van de post-coitum fase van alle drachtige dieren bloed worden afgenomen voor bepaling van de schildklierhormonen. Naast het feit dat de schildklierhormonen een natuurlijke daling laten zien tijdens de dracht, is het niet te verwachten dat er direct na start doseren op Dag 6 post-coitum een effect wordt gezien op de schildklierhormoonproductie. Door op twee momenten tijdens de post-coitum fase de schildklierhormoon waarden te bepalen, kan er tijdens de dracht worden bepaald aan welke niveaus schildklierhormoon de foetussen zullen worden blootgesteld en hoe het verloop zich verhoudt ten opzichte tot de controlegroep.

Naast de bloedafname voor de bepaling van de schildklierhormonen, zal er op Dag 20 (een dag voor sectie) op 6 verschillende tijdstippen (3 dieren/tijdstip) bloed afgenomen voor de bepaling van een toxicokinetisch profiel van PCN in het bloed van de moederdieren, zodat informatie wordt verzameld hoe de blootstelling aan PCN gedurende 24 uur na doseren verloopt.

In totaal zal er dus op drie momenten bloed af worden genomen voor alle moederdieren tijdens de post-coitum fase. Op de eerste twee momenten is dit een eenmalige bloedafname, op het derde moment zal dit een herhaalde bloedafname zijn voor toxicokinetische evaluatie (6 tijdstippen, 3 dieren per tijdstip, resulterend in 3 bloedafnames per dier).

In Part B zal er daarnaast op postnatale dag (PND) 4 (het cullen van de nesten) en PND 21 (het eindpunt van de studie) bloed afgenomen voor de bepaling van schildklierhormonen van de pups. Van de moederdieren zal er op PND 21 ook eenmalig bloed worden afgenomen voor de bepaling van schildklierhormonen.

Foetale blootstelling aan PCN is niet opgenomen in de huidige aanvraag. Waar mogelijk, wordt deze analyse wel uitgevoerd. Echter door het gelimiteerde bloedvolume wat van de foetussen verkregen kan worden, is het bloed in eerste instantie geprioriteerd voor de bepaling van schildklierhormonen (de belangrijkste uitlees parameter van deze studie).

11. Bij Refinement (2.D) benoemt u dat ook *sample size* bijdraagt aan de vermindering, maar de DEC acht dit niet waarschijnlijk gezien de opzet met een "benchmark dose (BMD)" (2.A). Kunt u dit beargumenteren?

Antwoord:

Hartelijk dank voor uw opmerking, het is inderdaad correct dat sample size in deze studie niet bijdraagt aan "refinement" en hierdoor ten onrechte in de tekst is beland. We hebben dit daarom ook verwijderd uit Hoofdstuk 2.D, daar de sample size reeds vooraf vast staat door de benchmark dose (BMD) approach die wij in deze studie opzet hebben gekozen.

NTS

12. De titel is erg lang en bovendien onbegrijpelijk voor leken. Zou u willen zorgen voor een lekentitel? -

Antwoord:

Titel aangepast in de niet-technische samenvatting en in project aanvraag 1.1.

13. Kunt u de NTS en de andere documenten beter op elkaar afstemmen, met name in het licht van vraag 1 hierboven?

Antwoord:

De NTS en de andere documenten zijn grondig nagelopen en waar nodig aangepast om de uniformiteit te waarborgen.

14. Het aantal dieren (3.3) is door allerlei opsplitsingen niet te volgen voor een leek. Ook hoort de term "ca." hier niet thuis. U kunt deze vraag beantwoorden met de diersoort en de maximale aantallen voor het hele project.

Antwoord:

Totaal aantal dieren genoteerd, opsplitsing verwijderd. Zie paragraaf 3.3, pagina 2

15. U schrijft bij 3.4 "Daarnaast kunnen negatieve gevolgen worden ondervonden door eventuele (tijdelijke) wijze van huisvesting." Kunt u dit toelichten in overeenstemming uw antwoord op vraag 6 hierboven?

Antwoord:

Korte toevoeging aan Bijlage NTS – Hoofdstuk 3.4 in overeenstemming met het antwoord op vraag 6.

16. Corrigeer spelfouten, zoals in samenstellingen die in het Engels los, maar in het Nederlands aan elkaar worden geschreven, bijv. "schildklierhormoonproductie", of draai dergelijke constructies om: productie van schildklierhormoon. Dit verhoogt de begrijpelijkheid voor de leek.

Antwoord:

NTS is grondig nagelopen op de aanwezigheid van spelfouten of onduidelijkheden voor de leek.

Algemeen:

De DEC wil u erop attenderen dat u in de NTS als partner het 5.1 lid1c noemt, wat gezien de openbare publicatie van de NTS misschien niet uw bedoeling is. Het staat u uiteraard vrij die keuze zelf te maken.

Antwoord: Dit is inderdaad verwijderd en verwijs nu naar een samenwerking met een Nederlands ziekenhuis. (zie ook NTS)

1. Kunt u helder maken waarom stoffen die direct op de schildklier werken niet relevant zijn voor onderzoek naar T4-levels en IQ?

Antwoord:

De vraagstelling richt zich op effecten op de schildklier via levermetabolisme. Als we een stof zouden kiezen die (ook) direct op de schildklier effect heeft, kunnen we niet onderscheiden of downstream effecten veroorzaakt zijn via effecten op de lever of (ook) direct via de schildklier. Daarmee zouden we onze vraagstelling specifiek gericht op de consequenties van lever-gemedieerde schildkliereffecten niet kunnen beantwoorden. De keuze voor een stof die niet direct op de schildklier werkt maar wel op de lever is dus essentieel (zie ook onderstaand antwoord op vraag 2).

2. U geeft aan dat u een stof hebt gekozen die specifiek via de lever een effect veroorzaakt op schildklierhormoon-levels (indirect mechanisme). Met de beschrijving wordt de impressie gewekt dat deze stof geselecteerd is op een CAR/PXR/UGT-lever/thyroid-werkingsmechanisme. Kunt u aangeven hoe deze (kinetische) lever en thyroid-parameters kwalitatief en kwantitatief vertaald kunnen worden van de rat naar de mens? Wanneer deze mechanismen niet één op één vertaalbaar zijn van rat naar mens, kunt u dan uitleggen hoe u toch tot transleerbaarheid naar de mens komt, en waarom specifiek dit indirecte werkingsmechanisme is geselecteerd (zie ook vraag 1)? Als het werkingsmechanisme van de geselecteerde stof anders is, kunt u dan uitleggen welk mechanisme dit betreft en hoe de te meten parameters kwalitatief en kwantitatief vertaalbaar zijn naar de beschikbare gegevens in de mens?

Antwoord:

De aanname van vertaalbaarheid naar de mens wordt gemaakt in de huidige toepassing van de regelgeving over stoffen met lever-gemedieerde schildkliereffecten. Er is een trend waarneembaar dat elk levereffect onafhankelijk van consequenties daarvan gezien in een dierstudie door risicobeoordelaars wordt geïnterpreteerd als een hormoonverstoring, mogelijk leidend tot kwalificatie van de stof als hormoonverstoorde. Daarbij is de specifieke discussie ontstaan of levereffecten op zich als hormoonverstoring moeten worden gezien. Dat leidt tot de directe vraag hoe de lijn van lever naar schildklier naar downstream effecten loopt in de dierstudie, zowel qua mechanisme als in termen van dosis-respons relatie. De relevantie daarvan voor de mens wordt daarbij impliciet aangenomen. Dat is dan ook het uitgangspunt voor deze studie. De studie is bedoeld als een landmarkstudie waarmee eens en voor al helder zal worden hoe de levermetabolisme-schildklieras werkt in de dierstudie en heeft dus belangrijke implicaties voor de risicoschatting van stoffen.

3. Zal in de tweede fase van het overkoepelende project (niet beschreven in deze aanvraag) bekeken worden hoe de MIE en KE zich verhouden tot de *ultimate adverse outcome*? Deze is in de humane situatie beschreven (verlaagd IQ in de nakomelingen), maar is nog niet gedefinieerd in diermodellen. Heeft u ook bepaalde neuromarkers voor ogen waarmee de embryonale ontwikkeling van bepaalde, bij cognitie betrokken, hersengebieden gevolgd kan worden?

Antwoord:

Het korte antwoord op het eerste deel van deze vraag is ja. Een vervolproject is voorzien waarin de downstream effecten in detail worden bestudeerd, met name effecten op het brein, waarvoor in de huidige proef weefsels verzameld zullen worden zoals aangegeven. Details daarvan zullen nog uitgewerkt worden, maar een uiterst gedetailleerde studie wordt voorzien. Deze tweestaps-procedure wordt gevolgd op aangeven van de subsidieverstrekker.

4. Gerelateerd hieraan: kunt u toelichten waarom u kiest voor de strategie om eerst op zoek te gaan naar moleculaire veranderingen en daarna pas na te gaan of in het model de uiteindelijke uitkomst ook gemeten kan worden in dit diermodel (verlaagd IQ), terwijl u aangeeft dat dit een uitdaging kan zijn ("dit is niet eenvoudig te testen in foetussen en pups van de rat")? Wij begrijpen niet waarom u niet eerst wilt zien of de transleerbaarheid van het

model gerealiseerd kan worden, waarna vervolgens op moleculair/cellulair niveau gezocht kan worden naar het mechanisme. Hiermee lijkt een deel van het doel van dit project niet realiseerbaar binnen de experimenten van dit project (3.2 doel). Zie 3.2: "This project aims at monitoring relevant maternal and offspring liver and thyroid parameters after prenatal exposure to the liver enzyme inducer pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) using Benchmark Dose (BMD) modelling in order to define quantitative relationships between the first three key events in the Adverse Outcome Pathway (AOP). Moreover, an extensive collection of tissues from the study will be stored for analysis, providing the opportunity for relating in-life results to adverse outcome parameters." Het wordt met deze studie niet duidelijk welke verschillen op moleculair en cellulair niveau relevant zijn. Dit omdat ze niet in dit project aan elkaar gerelateerd lijken te kunnen worden.

Antwoord:

De fasering van het project is van tevoren bepaald door de subsidiegever. Deze fasering is echter niet onlogisch, aangezien a priori vanuit de vraagstelling duidelijk is dat de lever en de schildklier de organen zijn die in detail onderzocht dienen te worden. De eerste stappen in de AOP zullen in lever en vervolgens schildklier optreden, en het zijn deze organen die we in hoge mate van detail volgen in deze studie. De parameters die normaliter in de regulatoire tox studies worden bepaald vinden we ook terug in deze proefopzet, die bovendien is aangevuld met additionele parameters, met name die waarmee effecten op levermetabolisme en schildklierhomeostase in zoveel mogelijk detail worden gemonitord. Daarmee leggen we de breedst mogelijke basis voor vervolgvergelijking met de adverse effecten die we in deel twee van deze studie zullen onderzoeken. Daarmee zullen we naar verwachting ook een (zoveel mogelijk kwantitatieve) AOP kunnen beschrijven. Dat maakt vervolgens mogelijk de vraag te beantwoorden hoe levereffecten beoordeeld moeten worden in relatie tot secundaire effecten op de schildklier en de beoordeling van stoffen als hormoonverstoorder.



Centrale Commissie Dierproeven

Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translatie of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hoger onderwijs of ople ding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Motivation

Thyroid hormones are critical for development of the fetal and neonatal brain, as well as for many other aspects of pregnancy and fetal growth. There is increasing evidence from epidemiological studies and patient reports that these hormones are already needed for orderly development during the first trimester, when the fetus is entirely dependent on the maternal transfer of thyroxine. Thyroxine (T4) is a prohormone and has to be converted intracellularly into the active hormone 3,5,3'-triiodothyronine (T3), which exerts its action via binding to the nuclear thyroid hormone receptors. A decrease in maternal circulating thyroxine during the first trimester may well result in irreversible mental and psychomotor impairments in children, e.g. lower IQ (Morreale, 2001).

As such, thyroid hormone level changes may cause adverse effects, not only in the thyroid but also in other tissues. The exposure to e.g. xenobiotics can induce hepatic metabolism causing elevation of phase I and phase II enzymes, which in turn may cause enhanced clearance of thyroid hormones (Barter & Klaassen, 1992; Liu et al., 1995; Shelby & Klaassen 2006; Viollo-Abadie et al., 2000), and thereby disturbing the thyroid hormone balance. Although the relation between thyroid hormones and hepatic metabolism has been studied extensively in adult rats, the consequences of such changes in pregnant rats for embryo-fetal and postnatal development have not been studied in that much detail. This is, however, of high relevance given the role of thyroid hormones in prenatal development, especially with regard to brain development.

Moreover, the role and understanding of thyroid hormones in pre- and postnatal development became of more importance, as the OECD guideline studies on developmental and reproductive toxicology (OECD TG 421, 422 and more recently OECD414) were updated with thyroid measurements – for reasons including the above-mentioned mental and psychomotor impairments in children. However, in the absence of concomitantly observed adverse health effects *in vivo*, the interpretation of physiological and hormonal changes in relation to endocrine disruption is very difficult and therefore a highly relevant subject in regulatory toxicology. The significant differences of viewpoints within the scientific and regulatory communities result in controversy on how to define endocrine disruptors and indicates that a fundamental understanding of relevant adverse outcome pathways is needed to be able to translate the effects observed *in vivo* on thyroid hormones to human risk for endocrine disruption.

Approach

Given the ongoing controversy on how to define endocrine disruptors it is imperative that a fundamental quantitative understanding of relevant adverse outcome pathways is needed. This multi-stakeholder project funded by the 5.1 lid2f will lay the groundwork for quantitatively defining the molecular interactions and responses in the liver-thyroid area after prenatal exposure, providing the basis for relating molecular and physiological changes ("Stage 1") to adverse outcome in the rat, followed by extrapolation to the human in Stage 2 of the project.

Stage 1 will aim to develop an adverse outcome pathway (AOP) for the effect of increased maternal TH metabolism on fetal and neonatal brain development. As such, quantitative relationships have to be determined between the molecular initiating event (MIE) and the subsequent key events (KE). Once these events are mapped and knowledge is gained on what is happening at different levels in the liver and

Met opmerkingen [dGM1]: Toegevoegd nav Vraag 1 en 2

Met opmerkingen [dGM2]: Toegevoegd nav Vraag 1 en 2

Met opmerkingen [dGM3]: Toegevoegd nav Vraag 1 en 2

Met opmerkingen [dGM4]: Toegevoegd nav Vraag 1 en 2

thyroid (e.g. gene and cellular levels), this data will be used to investigate the relation of these alterations with the ultimate adverse outcome (e.g. brain morphology of the fetuses and pups) in Stage 2 of this multi-stakeholder project. The eventual goal of the complete multi-stakeholder project (including Stage 2) is to compare the data obtained from the study in rats -described in this application- to humane data collected at the 5.1 lid1c, and determine what the relation is between the hormonal changes observed in rats and the observations in human neonates exposed to lowered thyroid hormone levels during the pregnancy (e.g. low IQ levels), and will be the aim of this multi-stakeholder project.

Met opmerkingen [dGM5]: Toegevoegd nav vraag 1 en 2

Background

Thyroid hormones are critical for development of the fetal and neonatal brain, as well as for many other aspects of pregnancy and fetal growth. There is increasing evidence from epidemiological studies and patient reports that these hormones are already needed for orderly development during the first trimester, when the fetus is entirely dependent on the maternal transfer of thyroxine. Thyroxine (T4) is a prohormone and has to be converted intracellularly into the active hormone 3,5,3'-triiodothyronine (T3), which exerts its action via binding to the nuclear thyroid hormone receptors. A decrease in maternal circulating thyroxine during the first trimester may well result in irreversible mental and psychomotor impairments (Morreale, 2001).

Met opmerkingen [dGM6]: Verplaatst nav vraag 1 en 2

Thyroid hormone homeostasis is controlled by a complex interplay of checks and balances in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (Figure 1). Hypothalamic Thyroid Releasing Hormone (TRH) stimulates pituitary Thyroid Stimulating Hormone (TSH) release from the pituitary, which in turn stimulates Thyroid Hormone (TH) production by the thyroid. Negative feedback loops run from thyroid hormone levels in the blood to pituitary and hypothalamus to provide homeostasis. TH is transported in the blood via binding to binding proteins like TBG. Once taken up in the cell, TH can be metabolized by different routes. The main routes are deiodination by sulfation, glucuronidation and deiodinating enzymes. The interplay between different TH activating and inactivating pathways determines the intracellular concentration of active T3 in the cell and thus cellular and tissue function.

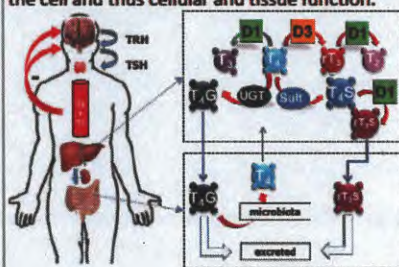


Figure 1. Thyroid hormone homeostasis and metabolism

One of the metabolic pathways by which chemicals may cause effects on thyroid hormone homeostasis is induction of hepatic glucuronidation of T3 and T4 by glucuronyl transferase (UGT) enzymes. The active T3 becomes inactive when a glucuronic acid is transferred to its hydroxyl group and T4 can no longer be converted into active T3 after glucuronidation. Moreover, glucuronidated iodothyronines are excreted into the bile and excreted through feces. As a consequence, T3 and T4 plasma levels may decrease resulting in hypothyroidism. Similarly, chemicals may cause increased sulfotransferase (SULT) activity in the liver, leading to increased hepatic TH sulfation and decreased levels of TH in plasma.

Increased biliary elimination of thyroid hormone is not only caused by increased hepatic activity of conjugating enzymes. Alternatively, increased biliary elimination may be due to induced transport of