

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 Van, 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.
- Norraele 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-glucuronosyltransferase 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 d t 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 (Stage 1 of the abovementioned multi-stakeholder project) aims at monitoring 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). 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.

Met opmerkingen [dGM7]: Toegevoegd nav vraag 1

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~~ *in vivo* study will be performed at 5.1 lid2h At 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~~ *in vivo* 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 lid2f 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 lid2f using methods optimized by Schuur et al. (1997; 1999). The 5.1 lid2f 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 lid2f 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 lid2f 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 lid2f (Hessel et al., 2018).

References:

Ackermans MT, Kettelarij-Haas Y, Boelen A, Ender 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.
- 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 JC, 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).

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.

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 *in vivo*, 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 **multi-stakeholder** project will lay the groundwork for quantitatively defining the molecular interactions and responses in the liver-thyroid area

Met opmerkingen [dGM8]: Toegevoegd ten behoeve van uniformiteit; vraag 13

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 possible future projects (Stage 2).

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 **Stage 1** of the proposed **multi-stakeholder project – i.e. the current application** 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-16alpha-carbon trile (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 (**not performed as part of the current application, but in Stage 2 of the multi-stakeholder project**).

Met opmerkingen [dGM9]: Aangepast nav vraag 1

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 (possible adverse effects on clinical signs, body weight and food consumption), 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 (i.e. the absence of adverse effects on clinical signs, body weight and food consumption).

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/117q223. 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 after repeated exposure (i.e. the absence of adverse effects on clinical signs, body weight and food consumption), as currently experience on the tolerability of PCN in the rat at higher dose levels for an extended dosing period 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.

Met opmerkingen [dGM10]: Toegevoegd nav vraag 4 en 13

Met opmerkingen [dGM11]: Toegevoegd nav vraag 4 en 13

- 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 *in vivo* study (**Stage 1 of the multi-stakeholder project**) assesses the liver-mediated thyroid toxicity after prenatal exposure of PCN in the rat. First, a pilot (Dose Range Finder, **Part A**) study with PCN will be performed in non-pregnant rats, to confirm that the model compound is tolerated (**i.e. the absence of adverse effects on clinical signs, body weight and food consumption**) after repeated exposure 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 **repeated exposure to 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).

Met opmerkingen [dGM12]: Toegevoegd nav vraag 4 en 13

Overall, these *in vivo* 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 (**Stage 1 of the multi-stakeholder 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 (**not performed as part of the current application, but in Stage 2 of the multi-stakeholder project**).

Met opmerkingen [dGM13]: Aangepast nav vraag 1

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	



Centrale Commissie Dierproeven

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'.

S.1823

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

S.1823

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 (i.e. the absence of adverse effects on clinical signs, body weight and food consumption after repeated exposure) 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/moribundity 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.

Met opmerkingen [dGM1]: Toegevoegd nav vraag 4

- **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 (animals will be housed per 3 females and will be separated <5 minutes per day; e.g. for oral gavage, body weight measurements and/or observation purposes).
- **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.

Met opmerkingen [dGM2]: Toegevoegd nav vraag 6

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 order 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 (for example body weight loss >10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) 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.

Met opmerkingen [dGM3]: Toegevoegd nav vraag 5

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 or 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 (e.g. application of ointment on non-toxicologically relevant wounds).

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

Met opmerkingen [dGM4]: Toegevoegd nav vraag 7

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 endpoints (ENV/JM/MOMO/2000/7). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wounds, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.

Met opmerkingen [dGM5]: Toegevoegd nav vraag 8

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



Centrale Commissie Dier

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'.

3.1.1.1234

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-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).

The *in vivo* 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 receptor, 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 (dams will be housed individually and animals will be separated from their litter/littermates [Part B only] <5-10 minutes per day; e.g., oral gavage, identification, body weight measurements and/or 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 Operating 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 minimize 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 group 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.

Met opmerkingen [dGM1]: Toegevoegd nav vraag 6

Table 1: number of animals per study

Type of study	Number of animals/study/group	Primary outcome measures
Part A	<p>F0-generation: 12 females in the control group 6 females/dose group (8 dose groups)</p> <p>F1-generation: 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>F0-generation: 12 females in the control group 6 females/dose group (8 dose groups)</p> <p>F1-generation: 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>F0-generation: 6 females in the control group 3 females/dose group (8 dose groups)</p> <p>F1-generation: 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.

D. Replacement, reduction, refinement

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.

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 updated 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 enhanced dose group 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.

Met opmerkingen [dGM2]: Verwijderd nav vraag 11

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 to 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 (for example body weight loss > 10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) or is in pain, the animal will be observed more intensively 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.

Met opmerkingen [dGM3]: Toegevoegd nav vraag 5

p. 1 lid 2) 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 lid 2h** 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 or during 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 on (e.g. application of ointment on non-toxicologically relevant wounds).

Met opmerkingen [dGM4]: Toegevoegd nav vraag 7

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-co turn phase) and a maximum level of cage enrichment will be applied according to 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 endpoints (ENV/JM/MOMO/2000/7). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wound, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.

Met opmerkingen [dGM5]: Toegevoegd nav punt 8

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



Centrale Commissie Dierproeven

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	Het effect van verlaagde schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens. 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 t/m 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 <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
--	--

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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 productie van schildklierhormoon 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 wat bijvoorbeeld kan leiden tot een verlaagd IQ.</p>
---	---

Met opmerkingen [BS1]: NTS Punt 16 – spellfouten en uniformiteit door gehele bestand.

Met opmerkingen [BS2]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1 en 2

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 het effect van xenobiotica veelvuldig is onderzocht in volwassen ratten, is het effect van deze stoffen tijdens de zwangerschap in de rat nog niet goed onderzocht. **Belangrijker nog: er ontbreekt in de huidige dierstudies een goede uitkomstmaat om de verstoorde hormoonwaarden in de dieren te vertalen naar risico's voor de mens.**

Met opmerkingen [B53]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

Deze aanvraag is onderdeel van een overkoepeld project dat uit meerdere fasen bestaat. De eerste fase van het project bestaat uit het uitvoeren van de dierproef die in dit document wordt beschreven. In deze eerste fase willen we vaststellen welke mechanismen bijdragen aan een verlaging van schildklierhormonen na blootstelling aan xenobiotica in de rat. Wanneer dit bekend is, zal in een tweede fase (niet verder beschreven in deze samenvatting) worden bepaald of en hoe de verlaging van de concentratie van schildklierhormonen door xenobiotica leidt tot negatieve effecten op de ontwikkeling van het embryo en de foetus van de rat. Daarnaast zal er gekeken worden naar een uitkomstmaat in de rat die gebruikt kan worden voor risico-evaluatie voor de mens, dit in samenwerking met het SI bdtc.

Met opmerkingen [B54]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

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

Doelstelling

Het doel van dit project is daarom het **in kaart brengen van de mechanismes achter de verstoorte productie van schildklierhormonen door xenobiotica (inclusief de rol van de schildklier en de lever in dit proces), welke nevelen deze verstoring heeft karakteriseren van het effect van lever-gemedieerde schildklier toxiciteit op de ontwikkeling van het embryo, de foetus en de pup, en hoe dit effect vertaald kan worden naar een risico voor de mens.**

Met opmerkingen [B55]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

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

De opbrengsten van **deze dierstudie (fase 1 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. **Wanneer deze interacties zijn gedefinieerd, zal er gekeken worden naar een uitkomstmaat in de rat die voorspellend zal zijn voor het potentiële risico voor de mens wanneer een stof een effect heeft op de schildklierhormoonbalans (fase 2 van het project).**

Met opmerkingen [B56]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

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 richtlijn studies specifieke parameters toegevoegd welke de hormoonversturende 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 **in de dieren**, is momenteel nog controversieel binnen de regulatoire toxicologie. **Dit is voornamelijk te wijten aan het feit dat in de dierstudies uitgevoerd volgens de richtlijnen een passende uitkomstmaat mist die de vertaalslag naar de mens mogelijk maakt.**

Met opmerkingen [B57]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

Gezien de voortdurende controversie over het definiëren van hormoonontregelaars, is het belangrijk dat de basiskennis over het werkingsmechanisme, die nu nog onvoldoende is, wordt uitgebreid **en dat de informatie die uit dierstudies komt over de concentraties van**

schildklierhormonen kan worden vertaald naar een risico-evaluatie voor de mens.

Met opmerkingen [B58]: NTS Punt 13 – afstemming met antwoord vraag 1

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
Diersoort: Rat
Aantal dieren: 2112

Met opmerkingen [B59]: NTS Punt 14 – aantal dieren niet opsplitsen voor verduidelijking.

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 (de dieren zullen tijdens dit project alleen gehuisvest worden vanwege de dracht en de verwachte nesten. Daarnaast zullen ze korte tijd gescheiden zijn van hun kooigenoten of nest tijdens het doseren en observeren. Dit kan als ongerief worden beschouwd omdat de rat een sociale diersoort is).

Met opmerkingen [B510]: NTS Punt 15

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 doelw tsystemen 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 uitbrede de 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 l teratuurstudie 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 u t 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: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 26 september 2019 13:40
Aan: Info-zbo
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: Aanvraag vergunning [redacted] project - AVD [redacted] 20198486 verdere toelichting
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

34

Geachte 5.1 lid2e,

Via de NetFTP verbinding heb ik de gevraagde respons op projectaanvraag AVD [redacted] 0198486 naar de CCD gezonden.

De verduidelijkingen zijn opgenomen in de herzien NTS-bijbeschrijving en twee aangepaste bijlagen (Dose Range Finder Study & Main Study Part A+B).

Wij zien uit naar de evaluatie van de CCD in haar vergadering van 27 september.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

From: Info-zbo
Sent: vrijdag 20 september 2019 17:07
To: 5.1 lid2e
Subject: [External]: RE: Aanvraag vergunning [redacted] project

30

Geachte 5.1 lid2e,

Op 19 juli 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 [redacted] 20198486.

In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

- 1) In de NTS onder 3.1 schrijft u dat "een tweede fase (niet verder beschreven in deze samenvatting)". Deze zin is verwarrend omdat het hiermee kan lijken dat u in de NTS niet het hele project beschrijft. U kunt overwegen om de zin tussen haakjes te verwijderen uit de NTS. Ook willen wij u vragen deel 2 van het project minder prominent in de NTS op te nemen. Dit zal de leesbaarheid voor de leek vergroten.

- 2) In de NTS beschrijft u het ongerief voor de dieren als mild tot matig. In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondervinden. Dit dient in overeenstemming gemaakt te worden, waarbij duidelijk moet zijn voor maximaal hoeveel dieren matig ongerief verwacht wordt.
- 3) Het aantal dieren genoemd in de NTS (2112) lijkt niet overeen te komen met wat is beschreven in de aanvraag (12+1950=1962). Dit graag in overeenstemming maken of de dieraantallen verhelderen in de bijlage dierproeven.
- 4) U geeft aan de drachtige moederdieren solitair te huisvesten. Graag dit ook benoemen onder vraag F van de betreffende bijlage dierproeven.
- 5) Er is ons verzocht de looptijd van de vergunning aan te passen. Wij hebben de looptijd aangepast.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal worden besproken in de CCD vergadering van 27 september 2019. Indien uw reactie uiterlijk 26 september bij ons binnen is, kunnen wij uw reactie nog inbrengen in de vergadering.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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,
Namens Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2h

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: vrijdag 20 september 2019 14:36

Aan: info@zbo-ccd.nl

Onderwerp: Aanvraag vergunning 5.1 lid2h project

29

Beste CCD,

Vanuit het secretariaat van de DEC kreeg ik de bevestiging dat de aanvraag die wij hebben ingediend bij jullie is beland (in eerder communicaties ontvingen wij telkens het nummer 8486, echter weet ik niet of dit een aanvraag-specifiek nummer is).

Ik had echter nog een vraag, waarmee ik naar jullie werd doorgestuurd. In de huidige documenten is de looptijd van dit project gedefinieerd als 27 Sep 2019 t/m 31 Dec 2019 (dierexperiment). Echter is dit niet meer reëel haalbaar en zouden wij deze graag willen aanpassen zodat er voldoende tijd is om het experiment uit te voeren. De inhoud van de verdere aanvraag blijft daarbij natuurlijk ongewijzigd.

De nieuwe looptijd zal zijn: 01 Okt 2019 t/m 31 Dec 2020.

Bijgevoegd zijn de documenten waarin deze looptijd staat genoemd, deze heb ik voor de zekerheid alvast toegevoegd. Mochten er nog zaken ontbreken om dit te veranderen horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

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.



> 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

Datum 20 september 2019

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 19 juli 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. Wij gaan uw aanvraag beoordelen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Complexe aanvraag

Tijdens de beoordeling van uw aanvraag blijkt dit project dermate complex te zijn dat meer tijd nodig is om de aanvraag volledig te beoordelen. Als wij nog informatie nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. U krijgt binnen vijftig werkdagen nadat uw aanvraag compleet is, een beslissing op uw aanvraag. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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
drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



Advies aan CCD

Datum 20 september 2019

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20198486

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.
Aanvraagnummer: AVD20198486
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces



De DEC heeft 31 dagen gedaan over het maken van het advies. Zij hebben aangegeven de aanvraag inhoudelijk complex te hebben gevonden en hebben daarom deze tijd nodig gehad.

De DEC is nog gevraagd of ze de juiste versie van de NTS hebben ingediend, aangezien de verwijzing naar 5.1 lid1c nog in deze versie van de NTS staat.

De aanvrager zal nog de volgende vragen gesteld worden:

In de NTS onder 3.1 schrijft u dat "een tweede fase (niet verder beschreven in deze samenvatting)". Deze zin is verwarrend omdat het hiermee kan lijken dat u in de NTS niet het hele project beschrijft. U kunt overwegen om de zin tussen haakjes te verwijderen uit de NTS.

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar het 5.1 lid1c (onder 3.1).

In de NTS beschrijft u het ongerief voor de dieren als mild tot matig. In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondervinden. Dit dient in overeenstemming gemaakt te worden, waarbij duidelijk moet zijn voor maximaal hoeveel dieren matig ongerief verwacht wordt.

Het aantal dieren genoemd in de NTS (2112) lijkt niet overeen te komen met wat is beschreven in de aanvraag (12+1950=1962). Dit graag in

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD [REDACTED].pdf

Pagina: 1

Numme [REDACTED] 5.1 RD26 [REDACTED] um: 20-9-2019 14:06:27
ik vind 5.2 lid1 [REDACTED]

Nummer: 2 Auteur: [REDACTED] 5.1 RD26 [REDACTED] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 15:02:51
5.2 lid1 [REDACTED]

Nummer: 3 Auteur: [REDACTED] 5.1 RD26 [REDACTED] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 14:07:36
In projectvoorstel schrijven ze: 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:

5.2 lid1 [REDACTED]

	overeenstemming maken of verhelderen in de bijlage dierproeven.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Dose Range Finder Study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		12	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		1.950	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Pijnbestrijding Bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 (citaat):

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 (e.g. application of ointment on non-toxicologically relevant wounds).

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Dose Range Finder Study / Ratten (*Rattus norvegicus*): Citaat: 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.

De main studie zal in de vrouwelijke rat plaatsvinden, vandaar dat ook de DRF studie in vrouwtjes gedaan wordt.

- 3.4.4.2 Main Study (Part A + B) / Ratten (*Rattus norvegicus*): Vrouwelijke dieren. Het betreft onderzoek met drachtige dieren.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over: Strategie, transleerbaarheid, aangrijpingspunten van de modelstof, keuze modelstof, definitie tolerated dose, te verwachten adverse effects en verhouding hiervan tot de humane eindpunten, maximale duur "short term separation", te verwachten symptomen waarvoor pijnbestrijding nodig is, humane eindpunten, noodzaak en frequentie van bloedsampling, vermindering, NTS, inbedding van dit project in overkoepelend project. Citaat C8. 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.

Citaat C10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de 1 EU-richtlijn. De drachtige moederdieren worden solitair gehuisvest, de onderzoekers hebben voldoende gemotiveerd waarom dit noodzakelijk is.

Citaat C18. 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

[Faint, illegible text block, possibly a list or table of contents]

vrouwelijke (drachtige) dieren uit te voeren, maar van de nakomelingen worden wel beide geslachten gebruikt.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat: 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.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



1

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: 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.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.

Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C-vragen.

6.2 lid 1

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: General aim</p> <p>This project (Stage 1 of the abovementioned multi-stakeholder 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.</p> <p>Objectives of Proposed Research</p> <ul style="list-style-type: none">• 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. <p>Voldoende beschreven.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: 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).</p> <p>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.</p> <p>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 in vivo, 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 disrupters it is imperative that a fundamental quantitative understanding of relevant adverse outcome pathways is needed. This multi-stakeholder 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 (Stage 1) to adverse outcome in the rat, followed by extrapolation to the human in possible future projects (Stage 2).</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Voldoende beschreven.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat uit DEC advies (C7): 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 AMC (schildklierparameters bij knaagdieren), VU (fase II-essays) en RIVM (BMD-analyses, AOP). Daarmee is naar het oordeel van de DEC de kennis en kunde goed gewaarborgd.</p> <p>Het secretariaat 5.2 lid1</p>
---	--

3V's

<p>Vervanging</p>	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaat: 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.</p>
	<p>3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaat: 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.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaat: 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.</p>
	<p>3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaat: 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.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaten: 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.</p> <p>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.</p> <p>Animal welfare is of utmost importance. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g. play items and shelters for rodents).</p>

Animals are checked multiple times per day to timely detect discomfort and/or humane end points. In case an animal shows clear adverse effects (for example body weight loss >10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) 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.

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.

3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaten: 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 (for example body weight loss >10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) 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**. 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.

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.

3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Voldoende beschreven.	
3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Voldoende beschreven	
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Dose Range Finder Study	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Dose Range Finder Study	HEP: Citaat: 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.	Citaat: 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). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wounds, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)	HEP: <1%	Citaat: 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). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wound, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: Matig	

5 Samenvatting

De aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de 3V's en humane eindpunten om tot een besluit te komen. Het DEC advies kan

hieraan ten grondslag liggen.

De dieren zullen niet in alle gevallen pijnbestrijding krijgen, wanneer dit wel geïndiceerd is. Dit is voldoende beschreven.



5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 5.2 lid1

Het Secretariaat 5.2 lid1

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 20 september 2019
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20198486

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat.
Aanvraagnummer: AVD20198486
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>De DEC heeft 31 dagen gedaan over het maken van het advies. Zij hebben aangegeven de aanvraag inhoudelijk complex te hebben gevonden en hebben daarom deze tijd nodig gehad. De aanvraag is om die reden complex gemaakt. De aanvrager is hiervan op de hoogte gebracht.</p> <p>De DEC had niet de juiste versie van de NTS meegezonden. Deze is op verzoek later toegezonden.</p> <p>De aanvrager zal nog de volgende vragen gesteld worden:</p> <p>In de NTS onder 3.1 schrijft u dat "een tweede fase (niet verder beschreven in deze samenvatting)". Deze zin is verwarrend omdat het hiermee kan lijken dat u in de NTS niet het hele project beschrijft. U kunt overwegen om de zin tussen haakjes te verwijderen uit de NTS. Ook willen wij u vragen deel 2 van het project minder prominent in de NTS op te nemen. Dit zal de leesbaarheid voor de leek vergroten.</p> <p>Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar het 5.1 lid1c (onder 3.1).</p> <p>In de NTS beschrijft u het ongerief voor de dieren als mild tot matig. In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondervinden. Dit dient in overeenstemming gemaakt te worden, waarbij duidelijk moet zijn voor maximaal hoeveel dieren matig ongerief verwacht wordt.</p>
---------------	---

Het aantal dieren genoemd in de NTS (2112) lijkt niet overeen te komen met wat is beschreven in de aanvraag (12+1950=1962). Dit graag in overeenstemming maken of verhelderen in de bijlage dierproeven.

U geeft aan de drachtige moederdieren solitair te huisvesten. Graag dit ook benoemen onder vraag F van de betreffende bijlage dierproeven.

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Dose Range Finder Study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		12	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		1.950	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Pijnbestrijding Bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 (citaat):

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 (e.g. application of ointment on non-toxicologically relevant wounds).

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Dose Range Finder Study / Ratten (*Rattus norvegicus*): Citaat: 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.

De main studie zal in de vrouwelijke rat plaatsvinden, vandaar dat ook de DRF studie in vrouwtjes gedaan wordt.

- 3.4.4.2 Main Study (Part A + B) / Ratten (*Rattus norvegicus*): Vrouwelijke dieren. Het betreft onderzoek met drachtige dieren.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over: Strategie, transleerbaarheid, aangrijpingspunten van de modelstof, keuze modelstof, definitie tolerated dose, te verwachten adverse effects en verhouding hiervan tot de humane eindpunten, maximale duur "short
-------------------	---

term separation", te verwachten symptomen waarvoor pijnbestrijding nodig is, humane eindpunten, noodzaak en frequentie van bloedsampling, vermindering, NTS, inbedding van dit project in overkoepelend project.

Citaat C8. 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.

Citaat C10. 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.

Citaat C18. 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.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat: 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.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: De DEC heeft deze adviesaanvraag ervaren als een zeer complex dossier dat veel discussie heeft gevergd. 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.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.

Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C-vragen.

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling

Doelstelling

Citaat: General aim

This project (Stage 1 of the abovementioned multi-stakeholder 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.

Voldoende beschreven.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: 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).</p> <p>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.</p> <p>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 in vivo, 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 disrupters it is imperative that a fundamental quantitative understanding of relevant adverse outcome pathways is needed. This multi-stakeholder 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 (Stage 1) to adverse outcome in the rat, followed by extrapolation to the human in possible future projects (Stage 2).</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Voldoende beschreven.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat uit DEC advies (C7): 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 AMC (schildklierparameters bij knaagdieren), VU (fase II-essays) en RIVM (BMD-analyses, AOP). Daarmee is naar het oordeel van de DEC de kennis en kunde goed gewaarborgd.</p> <p>Het secretariaat 5.2 lid1</p>
---	--

3V's

<p>Vervanging</p>	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaat: 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.</p>
	<p>3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaat: 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.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaat: 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.</p>
	<p>3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaat: 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.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Citaten: 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.</p> <p>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.</p> <p>Animal welfare is of utmost importance. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g. play items and shelters for rodents).</p>

Animals are checked multiple times per day to timely detect discomfort and/or humane end points. In case an animal shows clear adverse effects (for example body weight loss >10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) 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.

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.

3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Citaten: 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 (for example body weight loss >10% between two measurements and/or absence of food consumption over one period with or without toxicologically relevant clinical signs) 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. 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.

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.

3.4.4.1 Dose Range Finder Study: Voldoende beschreven.	
3.4.4.2 Main Study (Part A + B): Voldoende beschreven	
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Dose Range Finder Study	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Dose Range Finder Study	HEP: Citaat: 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.	Citaat: 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). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wounds, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)	HEP: <1%	Citaat: 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). In addition, the animals will be monitored twice daily for their general health. Animals will be handled every day during dosing, so wound, abnormal behavior etc., will be noticed within (maximally) 24 hours after occurrence. Body weight and food consumption will be measured regularly (at least for 3 periods during the study). These actions minimize the occurrence of reaching humane endpoints (e.g. body weight loss >10% between two measurements with or without the presence of clinical signs). The veterinarian will be available at all times for consultation.
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: Matig	

5 Samenvatting

De aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de 3V's en humane eindpunten om tot een besluit te komen. Het DEC advies kan

hieraan ten grondslag liggen.

De dieren zullen niet in alle gevallen pijnbestrijding krijgen, wanneer dit wel geïndiceerd is. Dit is voldoende beschreven.

5.2 lid1

In het projectvoorstel onder vraag 3.4.2 beschrijft de onderzoeker de handelingen aan de dieren, en schrijft hierbij dat deze handelingen niet gelimiteerd zijn tot wat daar beschreven is. In de bijlage dierproeven worden handelingen wel gelimiteerd. In de beschikking zal vermeld worden dat enkel de handelingen die beschreven zijn in de bijlage dierproeven mogen worden uitgevoerd.

Drachtige moederdieren worden individueel gehuisvest. Dit is voldoende onderbouwd.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 5.2 lid1

Het Secretariaat 5.2 lid1

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 30 september 2019 09:04
Aan: Info-zbo
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: [External]: Vervolg aanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

37

Geachte 5.1 lid2e

Graag stemmen wij in met het door de CCD gedane voorstel om de NTS-titel van aanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486 te wijzigen in:

Het effect van een verlaagd peil van schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens.

Met dank voor de acties/suggesties van de CCD, zien wij graag het goedkeuringsbesluit tegemoet.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2f

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

From: 5.1 lid2e
Sent: maandag 30 september 2019 8:47
To: Info-zbo
Cc: 5.1 lid2e
Subject: RE: [External]: Vervolg aanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486
Geachte 5.1 lid2e

36

Dank voor de –positieve- terugkoppeling van de CCD.

Ik zal de voorgestelde aanpassing van de 'NTS-titel' even bespreken met de aanvragers en u hiervan op de hoogte stellen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Sent: maandag 30 september 2019 8:42

35

To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: [External]: Vervolg aanvraag AVD^{5.1 lid2h} 20198486
Geachte 5.1 lid2e,

Dank u voor het toesturen van de reactie op de door ons gestelde vragen. De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens deze toe te wijzen.

De CCD is echter van mening dat "verlaagde schildklierhormonen", zoals benoemd in de titel van uw NTS, niet correct is. Zij zouden dit graag veranderd zien naar verlaagd peil of verlaagde hormoonspiegels.

Wij mogen zelf geen wijzigingen doorvoeren in uw NTS zonder uw toestemming. Kunt u zich erin vinden dat wij de titel van uw NTS aanpassen van:

Het effect van verlaagde schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens.
Naar

Het effect van een verlaagd peil van schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: donderdag 26 september 2019 13:40

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

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: Aanvraag vergunning 5.1 lid1e project - AVD^{5.1 lid2h} 20198486 verdere toelichting

Geachte 5.1 lid2e,

Via de NetFTP verbinding heb ik de gevraagde respons op projectaanvraag AVD^{5.1 lid2h} 20198486 naar de CCD gezonden.

De verduidelijkingen zijn opgenomen in de herzien NTS-bijbeschrijving en twee aangepaste bijlagen (Dose Range Finder Study & Main Study Part A+B).

Wij zien uit naar de evaluatie van de CCD in haar vergadering van 27 september.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

From: Info-zbo

Sent: vrijdag 20 september 2019 17:07

To: 5.1 lid2e

Subject: [External]: RE: Aanvraag vergunning 5.1 lid1e project

Geachte 5.1 lid2e,

Op 19 juli 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.

In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

- 1) In de NTS onder 3.1 schrijft u dat "een tweede fase (niet verder beschreven in deze samenvatting)". Deze zin is verwarrend omdat het hiermee kan lijken dat u in de NTS niet het hele project beschrijft. U kunt overwegen om de zin tussen haakjes te verwijderen uit de NTS. Ook willen wij u vragen deel 2 van het project minder prominent in de NTS op te nemen. Dit zal de leesbaarheid voor de leek vergroten.
- 2) In de NTS beschrijft u het ongerief voor de dieren als mild tot matig. In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren maximaal matig ongerief zullen ondervinden. Dit dient in overeenstemming gemaakt te worden, waarbij duidelijk moet zijn voor maximaal hoeveel dieren matig ongerief verwacht wordt.
- 3) Het aantal dieren genoemd in de NTS (2112) lijkt niet overeen te komen met wat is beschreven in de aanvraag (12+1950=1962). Dit graag in overeenstemming maken of de dieraantallen verhelfden in de bijlage dierproeven.
- 4) U geeft aan de drachtige moederdieren solitair te huisvesten. Graag dit ook benoemen onder vraag F van de betreffende bijlage dierproeven.
- 5) Er is ons verzocht de looptijd van de vergunning aan te passen. Wij hebben de looptijd aangepast.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal worden besproken in de CCD vergadering van 27 september 2019. Indien uw reactie uiterlijk 26 september bij ons binnen is, kunnen wij uw reactie nog inbrengen in de vergadering.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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,

Namens Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: vrijdag 20 september 2019 14:36

Aan: info@zbo-ccd.nl

Onderwerp: Aanvraag vergunning 5.1 lid2e project

Beste CCD,

Vanuit het secretariaat van de DEC kreeg ik de bevestiging dat de aanvraag die wij hebben ingediend bij jullie is beland (in eerder communicaties ontvingen wij telkens het nummer 8486, echter weet ik niet of dit een aanvraag-specifiek nummer is).

Ik had echter nog een vraag, waarmee ik naar jullie werd doorgestuurd. In de huidige documenten is de looptijd van dit project gedefinieerd als 27 Sep 2019 t/m 31 Dec 2019 (dierexperiment). Echter is dit niet meer reëel haalbaar en zouden wij deze graag willen aanpassen zodat er voldoende tijd is om het experiment uit te voeren. De inhoud van de verdere aanvraag blijft daarbij natuurlijk ongewijzigd.

De nieuwe looptijd zal zijn: 01 Okt 2019 t/m 31 Dec 2020.

Bijgevoegd zijn de documenten waarin deze looptijd staat genoemd, deze heb ik voor de zekerheid alvast toegevoegd. Mochten er nog zaken ontbreken om dit te veranderen horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

29

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2h

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

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.



> 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 20198486

Bijlagen

1

Datum 3 oktober 2019

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 19 juli 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. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 3 oktober 2019 tot en met 31 december 2020.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 19 september 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 20 september 2019 en 30 september 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op verduidelijking van de NTS, inconsistenties tussen de NTS en het projectvoorstel, aanvulling individuele huisvesting, aanpassing van de looptijd van het project. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
3 oktober 2019
Aanvraagnummer:
AVC 1627 0198486

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

3 oktober 2019

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid 2e** 0198486

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid 2e

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 5.1 lid2h

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 oktober 2019 tot en met 31 december 2020, voor het project "Developing a quantitative AOP for liver-mediated thyroid modulation after prenatal exposure to a xenobiotic compound in the rat." met aanvraagnummer AV 5.1 lid2h 20198486, na advies van dierexperimentencommissie 5.1 lid2h

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 1.1 lid2e

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 19 juli 2019
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 19 september 2019;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Dose Range Finder Study, zoals ontvangen op 26 september 2019;
 - 3.4.4.2 Main Study (Part A + B), zoals ontvangen op 26 september 2019;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 1 oktober 2019;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 19 september 2019
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 26 september 2019, 30 september 2019, 1 oktober 2019.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Dose Range Finder Study			
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	12	Matig
3.4.4.2 Main Study (Part A + B)			
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	1.950	Matig

Aanvraagnummer:
AVD-1 6020 20198486

Aanvullende opmerking

In het projectvoorstel onder vraag 3.4.2 beschrijft u handelingen aan de dieren en u schrijft hierbij dat deze handelingen niet gelimiteerd zijn tot wat daar beschreven is. U mag onder deze vergunning alleen de handelingen met de dieren uitvoeren die in de bijlage dierproeven zijn beschreven. Andere handelingen dienen middels een melding of een wijziging aan de CCD kenbaar te worden gemaakt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD **3.1.1921** 20198486

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:

AVD^{5 1 jid21}20198486

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.



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	Het effect van een verlaagd peil van schildklierhormonen tijdens de zwangerschap op de nakomelingen – van rat naar mens.
1.2 Looptijd van het project	01 Okt 2019 t/m 31 Dec 2020 (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 productie van schildklierhormoon 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 wat bijvoorbeeld kan leiden tot een verlaagd IQ.</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 veelvuldig is onderzocht in volwassen ratten, is het effect van deze stoffen tijdens de zwangerschap in de rat nog niet goed onderzocht. Belangrijker nog: er ontbreekt in de huidige dierstudies een goede uitkomstmaat om de verstoorde hormoonwaardes in de dieren te vertalen naar risico's voor de mens.

Deze aanvraag is onderdeel van een overkoepeld project dat uit meerdere fasen bestaat. De eerste fase van het project bestaat uit het uitvoeren van de dierproef, die in dit document wordt beschreven. In deze eerste fase willen we vaststellen welke mechanismen bijdragen aan een verlaging van schildklierhormonen na blootstelling aan xenobiotica in de rat.

Doelstelling

Het doel van de dierstudie is het in kaart brengen van de mechanismes achter de verstoorde productie van schildklierhormonen door xenobiotica (inclusief de rol van de schildklier en de lever in dit proces).

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

De opbrengsten van deze dierstudie 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. Wanneer deze interacties zijn gedefinieerd, kan er gekeken worden naar een uitkomstmaat in de rat die voorspellend zal zijn voor het potentiële risico voor de mens wanneer een stof een effect heeft op de schildklierhormoonbalans.

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 in de dieren, is momenteel nog controversieel binnen de regulatoire toxicologie. Dit is voornamelijk te wijten aan het feit dat in de dierstudies uitgevoerd volgens de richtlijnen een passende uitkomstmaat mist die de vertaalslag naar de mens mogelijk maakt.

Gezien de voortdurende controverse over het definiëren van hormoon ontregelaars, is het belangrijk dat de basiskennis over het werkingsmechanisme, die nu nog onvoldoende is, wordt uitgebreid en dat de informatie die uit dierstudies komt over de concentraties van schildklierhormonen kan worden vertaald naar een risico-evaluatie voor de mens.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Diersoort: Rat
Aantal dieren: 1962

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 (de dieren zullen tijdens dit project alleen gehuisvest worden, vanwege de dracht en de verwachte nesten. Daarnaast zullen ze korte tijd gescheiden zijn van hun kooigenoten of nest tijdens het

doseren en observeren. Dit kan als ongerief worden beschouwd omdat de rat een sociale diersoort is).

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 maximaal 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: vrijdag 25 oktober 2019 11:06
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20198486

40

Geachte 5.1 lid2h,

Op 19-07-2019 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het 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 0198486.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op verduidelijking van de NTS, inconsistenties tussen de NTS en het projectvoorstel, aanvulling individuele huisvesting, aanpassing van de looptijd van het project.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 3-10-2019.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

In het projectvoorstel onder vraag 3.4.2 beschrijft u handelingen aan de dieren en u schrijft hierbij dat deze handelingen niet gelimiteerd zijn tot wat daar beschreven is. U mag onder deze vergunning alleen de handelingen met de dieren uitvoeren die in de bijlage dierproeven zijn beschreven. Andere handelingen dienen middels een melding of een wijziging aan de CCD kenbaar te worden gemaakt.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C-vragen.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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