

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20172125	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage dierproeven 2 oud				x	x		x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Bijlage dierproeven 2 nieuw				x	x		x	
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Academisch Medisch Centrum Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>343362777</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meibergdreef</td><td>31</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1105AZ</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL68RABO0136166741</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Factuur sturen aan: AMC crediteurenadministratie Postbus 400 1115 ZJ Duivendrecht o.v.v. Kostenplaatsnummer 7525</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Medisch Centrum Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]		KvK-nummer	343362777		Straat en huisnummer	Meibergdreef	31	Postbus			Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam	IBAN	NL68RABO0136166741		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Factuur sturen aan: AMC crediteurenadministratie Postbus 400 1115 ZJ Duivendrecht o.v.v. Kostenplaatsnummer 7525	
Naam instelling of organisatie	Academisch Medisch Centrum Amsterdam																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																									
KvK-nummer	343362777																									
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31																								
Postbus																										
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam																								
IBAN	NL68RABO0136166741																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Factuur sturen aan: AMC crediteurenadministratie Postbus 400 1115 ZJ Duivendrecht o.v.v. Kostenplaatsnummer 7525																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Principal Investigator</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Center for Experimental Molecular Medicine</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	Principal Investigator	Afdeling	Center for Experimental Molecular Medicine	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]														
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]																									
Functie	Principal Investigator																									
Afdeling	Center for Experimental Molecular Medicine																									
Telefoonnummer	[Redacted]																									
E-mailadres	[Redacted]																									
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Center for Experimental Molecular Medicine</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	Onderzoeker	Afdeling	Center for Experimental Molecular Medicine	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]														
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]																									
Functie	Onderzoeker																									
Afdeling	Center for Experimental Molecular Medicine																									
Telefoonnummer	[Redacted]																									
E-mailadres	[Redacted]																									

- | | | | |
|-----|--|---|--|
| 1.6 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning. | (Titel) Naam en voorletters | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| | | Functie | |
| | | Afdeling | |
| | | Telefoonnummer | |
| | | E-mailadres | |
| 1.7 | Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde? | ☐ Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>
☐ Nee | |

2 Over uw aanvraag

- | | |
|---|--|
| <p>2.1 Wat voor aanvraag doet u?</p> | <p>☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3</p> |
| | <p>☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</p> <p>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2</p> |
| | <p>☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn</p> <p>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3</p> |
| <p>2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?</p> | <p>☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier</p> |
| | <p>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</p> |
| <p>2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?</p> | <p>☐ Nee > Ga verder met vraag 3</p> |
| | <p>☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6</p> |

3 Over uw project

- | | | | | | | | | |
|-------------|--|--|------------|--------------|-----------|-----------------|-------------|--|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | <table border="1"> <tr> <td>Startdatum</td> <td>1 - 1 - 2018</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>31 - 12 - 2022</td> </tr> </table> | Startdatum | 1 - 1 - 2018 | Einddatum | 31 - 12 - 2022 | | |
| Startdatum | 1 - 1 - 2018 | | | | | | | |
| Einddatum | 31 - 12 - 2022 | | | | | | | |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden | | | | | | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Het ontwikkelen van darmkanker preventie strategieën | | | | | | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | <table border="1"> <tr> <td>Naam DEC</td> <td>DEC AMC</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>Meibergdreef 31</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table> | Naam DEC | DEC AMC | Postadres | Meibergdreef 31 | E-mailadres | |
| Naam DEC | DEC AMC | | | | | | | |
| Postadres | Meibergdreef 31 | | | | | | | |
| E-mailadres | | | | | | | | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ☐ Melding Machtiging
- ☐

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Amsterdam
Datum	
Handtekening	



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Darmkanker

Darmkanker is een van de meest voorkomende kanker-gerelateerde doodsoorzaken in de westerse wereld. Terwijl de prognose voor patiënten bij *vroege detectie* vrij goed is, met een kans op overleving van 80%, zal slechts 5% van de patiënten met *vergevoerde darmkanker met uitzaaiingen* na 5 jaar nog in leven zijn. Ondanks de recente ontwikkeling van nieuwe therapieën, is resistentie tegen chemotherapie nog steeds een groot probleem bij het behandelen van deze ziekte.

De ontwikkeling van darmkanker verloopt in verschillende fasen, beginnend bij een mutatie in een enkele cel, welke kan uitgroeien tot een (goedaardige) poliep (adenoom), tot een maligne tumor (coloncarcinoom), die eventueel uitzaaiingen (metastasen) veroorzaakt¹.

Kankerstamcellen in darmkanker

In de afgelopen jaren zijn er meer en meer aanwijzingen gekomen voor het bestaan van kankerstamcellen in het coloncarcinoom, de medische benaming voor darmkanker. Coloncarcinomen vertonen vaak nog enige gelijkenis met gezond darmweefsel. Zo lijken de glandulaire structuren van gedifferentieerd epitheelweefsel in het coloncarcinoom op de crypten die men in gezond darmepitheel aantreft. Onderin deze crypten, de instulpingen in het darmepitheel, bevinden zich de stamcellen, in het zogenoemde stamcelcompartiment. In een normale darm zijn de stamcellen verantwoordelijk voor de constante vervanging van het darmepitheel, waarbij een deel van de stamcellen na deling differentieert tot gespecialiseerde epitheelcellen. De definitie van een stam cel is dan ook: een ongedifferentieerde cel die gedurende lange tijd zichzelf kan vernieuwen en waarvan de nakomelingen tot verschillende celtypes kunnen differentiëren².

Op eenzelfde manier zouden darmkankerstamcellen verantwoordelijk zijn voor tumorgroei, progressie en metastasering van het coloncarcinoom. Het bewijs voor het bestaan van deze kankerstamcellen is voornamelijk afkomstig van tumor-initiatie experimenten. Bij dit type experiment worden verschillende populaties kankercellen uit een tumor geselecteerd op basis van de expressie van bepaalde eiwitmarkers. Deze populaties worden vervolgens getest op de mogelijkheid tot tumor-initiatie door ze subcutaan te injecteren bij immuun-incompetente muizen. Cel-populaties die in staat zijn uit te groeien tot een tumor, met daarin de verschillende celtypes die ook in de oorspronkelijke tumor werden gevonden, inclusief de kankerstamcellen, worden tumor-initiërende cellen genoemd. Deze cellen voldoen aan de klassieke definitie van stamcellen, zelf-vernieuwing en de dochtercellen zijn in staat om tot verschillende celtypes te differentiëren, waardoor deze cel-populatie als de kankerstamcellen worden beschouwd. Gebaseerd op de "kankerstamcel-specifieke" eiwitmarkers die in dit soort experimenten gevonden zijn, wordt bovendien vaak verondersteld dat kankerstamcellen relatief resistent zijn tegen veel gebruikte vormen van therapie. Zo blijven juist de kankerstamcellen in leven na een ogenschijnlijk succesvolle chemotherapie behandeling. Deze cellen kunnen dan vervolgens weer uitgroeien tot een complete tumor.

Tijdens het ontstaan van darmkanker zijn gezonde stamcellen in de crypten in competitie met darmkankerstamcellen wat vaak leidt tot overname van de crypt door de kankercellen. Op dit moment is er nog weinig bekend over het effect van kanker mutaties op de stamcelcompetitie in de crypten. In gezonde crypten zijn alle stamcellen in neutrale competitie met elkaar, dit betekent dat de stamcellen elkaar vervangen op een stochastische manier³.

⁴. Ongeacht dat deze 'kankerstamcel' een voordeel heeft, betekent dit nog niet dat de hele crypt kwaadaardig wordt. Er bestaat nog steeds een kans dat de gezonde stamcellen deze kwaadaardige stamcel vervangen, waardoor de mutatie uit de crypte verdwijnt. Echter wanneer alle gezonde stamcellen zijn vervangen door 'mutante' stamcellen kan deze crypt nooit meer als gezond worden beschouwd, de crypt noemt men dan 'fixed' of gefixeerd. Daarnaast is de context waarin een mutatie ontstaat van belang, zo geeft een $p53^{R172H}$ mutatie in een gezonde darm geen voordeel, maar in een ontstoken (colitis) darm wel. Dat mutante kankerstamcellen door stochastische stamcel-vervanging uit de crypt kunnen verdwijnen voordat een crypt gefixeerd wordt en

hierdoor geen darmkanker kunnen ontwikkelen vormt een interessante mogelijkheid om chemopreventie strategieën op te baseren.

Het is van essentieel belang om de competitieve voordelen van darmkanker-gerelateerde mutaties, waaronder *Apc*, *PTEN*, *Msh2*, *BRAF* en *Pik3ca*, te bestuderen en kwantificeren. Deze mutaties zijn geassocieerd met familiale en erfelijke darmkankers, en mensen met deze mutaties zullen vrijwel zeker darmkanker ontwikkelen in hun leven. Ons project zal zich daarom volledig focussen op het ontwikkelen van chemopreventieve strategieën voor dit soort mutaties. Naast het kwantificeren van de competitieve voordelen van een darmkanker-gerelateerde mutaties zullen wij testen of er drugs zijn (zoals o.a. aspirine en Tankyrase remmer) die deze voordelen kunnen remmen en hierdoor als chemopreventie kunnen worden gebruikt. De resultaten van deze proeven zijn van essentieel belang voor het ontwikkelen van een chemopreventie strategie voor mensen zodat minder darmcrypten 'gefixeerd' worden met een mutatie en daardoor minder kanker ontstaat. De verkregen resultaten zullen dienen als een proof-of-principle voor de humane setting, en wij verwachten dan ook dat deze resultaten direct te vertalen zijn naar de humane context. Verder zullen wij de optimale concentratie van de werkende compound bepalen waarmee we de mutante stamcellen kunnen remmen zonder de gezonde stamcellen te beïnvloeden, om op deze manier de kans op het ontstaan van darmkanker te verkleinen. Deze chemotherapeutische strategieën worden vervolgens in een lange termijn proef gevalideerd. Samenvattend: wij willen een serie van experimenten uitvoeren die de kankerstamcel dynamiek kunnen beïnvloeden en hiermee de kans op het ontstaan van darmkanker te verminderen.

1. Fearon, E. F. & Vogelstein, B. for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
2. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
3. Snippert, H. J. *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143**, 134–144 (2010).
4. [REDACTED]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Algemene doelstelling: het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker.

- *Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?*
- *Kunnen eerder beschreven chemopreventieve compounds de normale stamcellen beïnvloeden?*
- *Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve compounds de mutante kankerstamcellen?*
- *Kunnen wij een optimale dosis van deze compounds bepalen?*
- *Kunnen wij deze compounds gebruiken om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?*

Haalbaarheid van het project:

In ons lab hebben we inmiddels meerdere van de benodigde marker-onafhankelijke labeling strategieën ontwikkeld en toegepast op verschillende stamcelmodellen. [REDACTED]

[REDACTED].
Het hier beschreven onderzoeksprogramma betreft de kern van de onderzoeksgroep en de proeven beschreven in deze aanvraag zullen uitgevoerd worden door 2 promovendi en 2 postdocs, ondersteunt door 2 analisten. Alle benodigde expertise is binnen onze groep aanwezig zowel voor de in vivo proeven hier beschreven alsook voor de ondersteunende proeven betreffende crypt isolatie en organoïde kweek culturen.

3.3 Belang

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

De resultaten van deze proeven zijn van essentieel belang voor het ontwikkelen van een chemopreventie strategie voor mensen. De verkregen resultaten zullen dienen als een proof-of-principle voor de humane setting, en wij verwachten dan ook dat deze resultaten direct te vertalen zijn naar de humane context.

Wetenschappelijk belang: De beschreven proeven zullen aantonen dat wij de stamceldynamiek van de darmen kunnen beïnvloeden waardoor mutaties minder snel gefixeerd worden in de darmcrypten en daarom de kans op het ontstaan van darmkanker verminderd.

Maatschappelijk belang: De laatste jaren is gebleken dat het erg lastig is om darmkanker te bestrijden omdat de darmkanker-geassocieerde mutaties al gefixeerd zijn in het genoom van stamcellen in de darmcrypten. Met de kennis van de hierin beschreven experimenten zal worden voorkomen dat mutaties gefixeerd kunnen worden in de darmcrypten, vóórdat darmkanker überhaupt kan ontwikkelen. Chemopreventie is daarom een optimale manier om het aantal darmkanker patiënten te verminderen en tegelijkertijd ook de gezondheidskosten te drukken. De gevonden resultaten zullen van belang zijn voor de algehele populatie, waar 1 op de 20 mensen darmkanker zal ontwikkelen tijdens zijn/haar leven. Echter, de resultaten zijn het allerbelangrijkst voor mensen binnen de populatie die een verhoogd risico hebben om darmkanker te ontwikkelen, omdat zij al een gemuteerd gen bezitten. De laatste cijfers van de Nederlandse Kankerregistratie laten zien dat in 2015 15.500 nieuwe patiënten met darmkanker zijn gediagnosticeerd, waarvan ongeveer 5% een erfelijke oorzaak heeft. Chemopreventie zou dus jaarlijks veel nieuwe darmkanker patiënten kunnen voorkomen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

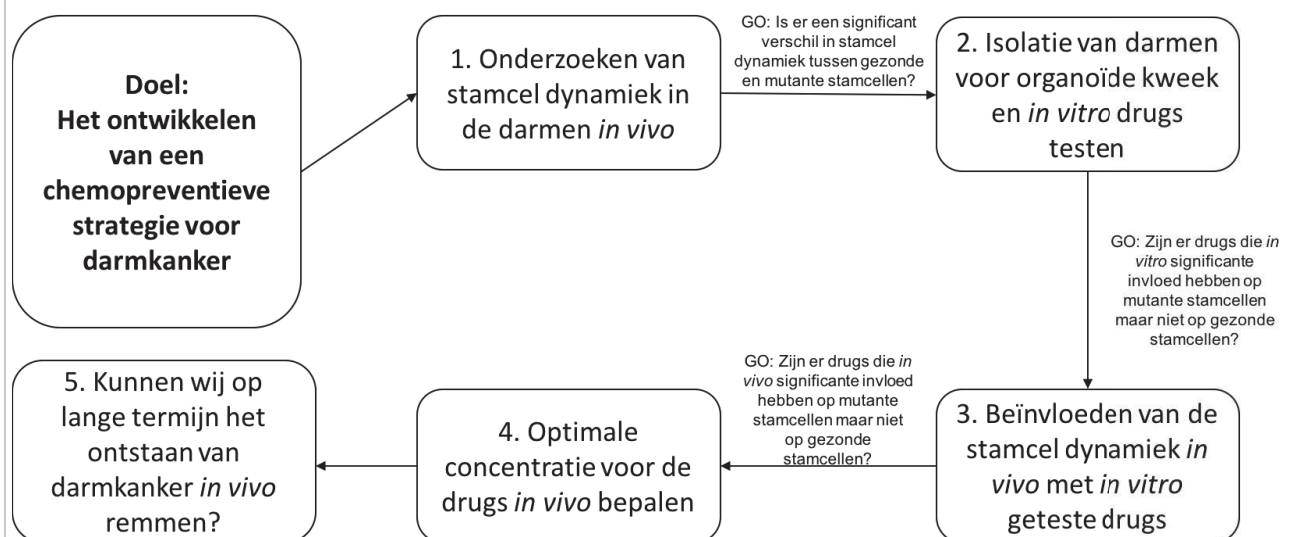
Algemene doelstelling: het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker. Om deze doelstelling te behalen zullen wij voornamelijk gebruik maken van muismodellen.

Met deze muismodellen kunnen wij onderstaande deelvragen beantwoorden:

- **Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?**

Met onze muismodellen kunnen wij stamceldynamiek bestuderen. De muizen worden vervolgens op verschillende tijdstippen geofferd zodat wij de darmen kunnen isoleren en gekleurde stamcellen in de crypten kunnen kwantificeren. Hieruit kunnen wij berekenen hoe lang het duurt voordat crypten worden gefixeerd met een mutatie. Wij zullen deze darmen vervolgens vergelijken met een controle muismodel dat géén mutatie maar wel een kleurenlabel induceert. Aan de hand van deze resultaten kunnen wij vervolgens bepalen of stamcellen met een darmkanker-geassocieerde mutatie een voordeel heeft t.o.v. gezonde stamcellen.

- **Kunnen eerder beschreven chemopreventieve compounds de normale stamcellen beïnvloeden?**
Er zijn verschillende drugs beschreven die de kans op darmkanker kunnen verminderen in de algehele populatie én voor individuen met een erfelijk kankersyndroom. Met deze deelvraag willen wij beantwoorden wat voor effect deze drugs hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen. Aspirine en AICA Ribonucleotide (AICAR) zijn bijvoorbeeld twee drugs waarvan gedacht wordt dat ze fixatie van respectievelijk *Apc* en *Msh2* in de darmcrypt voorkomen. Wij zullen ook drugs testen die gebaseerd op hun werkingsmechanisme kunnen dienen als positieve controle voor dit experiment. Deze drugs worden verwacht wel invloed te hebben op de stamceldynamiek maar kunnen waarschijnlijk nooit als therapie gebruikt worden doordat ze bekend zijn veel bijwerkingen veroorzaken.
- **Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve compounds de mutante kankerstamcellen?**
Als we de stamceldynamiek na het toedienen van de bovengenoemde compounds bepaald hebben, is het van belang om te onderzoeken of wij de stamceldynamiek van mutante stamcellen kunnen beïnvloeden.
- **Kunnen wij een optimale dosis van deze compounds bepalen?**
Met deze deelvraag proberen wij de optimale concentratie van een drug te bepalen waarmee we de mutante stamcellen kunnen remmen zonder al te veel bijwerkingen te creëren voor de gezonde stamcellen.
- **Kunnen wij deze compounds gebruiken om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?**
Met deze deelvraag willen wij alle bovengenoemde doelstellingen valideren: kunnen de geteste drugs op lange termijn het ontstaan van darmkanker tegengaan?



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

Het uitgangspunt van dit project is het begrijpen van de stamceldynamiek na het verkrijgen van een of meerdere darmkanker-geassocieerde mutaties en het ontwikkelen voor chemopreventieve strategieën om een eventueel competitief voordeel van deze mutante stamcellen tegen te gaan. Muismodellen om de stamceldynamiek te bestuderen en moduleren liggen aan de basis van dit project. Al deze muismodellen

zullen de volgende componenten bevatten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld Cre^{ERT2})
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

Muismodellen

Voor het beantwoorden van onze vragen zullen we verschillende zoals hierboven beschreven muismodellen gebruiken. De experimenten zullen 'controle' en 'mutante' muizen bevatten. De controle muizen zullen enkel een kleurlabel induceren in hun stamcellen. De mutante muizen zullen een mutatie induceren in hun stamcellen, het kleurlabel is optioneel en afhankelijk van het muismodel.

Organoïde culturen

Om het aantal muizen te verminderen zullen wij van alle muizenmodellen ook de darmen isoleren en organoïde culturen kweken om de drugs eerst op te testen.

Experimenten set 1. Stamceldynamiek kwantificeren

Voor alle CRC-geassocieerde mutaties die wij gaan onderzoeken zullen we gebruik maken van een mutant muismodel op basis van figuur 1. Door het eenmalig toedienen van Tamoxifen +/- bNF (afhankelijk van de intestinale promotor) zullen stamcellen in de crypten sporadisch een mutatie en een kleurlabel krijgen. Als deze stamcel zich deelt, zullen alle afstammelingen dezelfde mutatie en kleurlabel ontvangen. Door vervolgens op verschillende tijdstippen de muizen te offeren, de darmen te isoleren, en de labels in de darmen te kwantificeren, kunnen wij de stamceldynamiek modelleren. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken met een intestinale promotor en een label, maar zonder induceerbare mutatie. Met dit controlemodel kunnen wij de stamceldynamiek van gezonde darmcrypten modelleren.

Experimenten set 2. Drug screen op organoïde culturen

Om uiteindelijk een chemopreventieve strategie te ontwikkelen is het van groot belang om een breed spectrum aan remmers te testen. Deze remmers kunnen worden onderverdeeld in drie hoofdgroepen (1) anti-inflammatoire drugs (2) anti-morfogene drugs (3) anti-proliferatieve drugs. Daarnaast zullen wij ook drugs testen waarvan eerder is beschreven dat zij wellicht een effect kunnen hebben op de stamceldynamiek. Om het aantal muizen die we nodig hebben om al deze drugs te testen drastisch te beperken kunnen wij deze drug screen *in vitro* uitvoeren. Dit betekent dat wij de darmen van de mutante muismodellen zullen isoleren en hier organoïde culturen van groeien. De organoïde culturen hebben een zelfde structuur en functie als *in vivo* en zijn hierdoor een perfect model om de screen uit te voeren. Wij zullen de drugs daarom uittesten op organoïde culturen en zullen het effect van de drugs bekijken aan de hand van (1) groeisnelheid, (2) clonogeniteit, (3) en celdood. De compounds met de meest significante effecten zullen vervolgens *in vivo* getest worden.

Experimenten set 3. In vivo drug screen

Tijdens een *in vitro* organoïde screen hebben wij drugs gevonden die een effect kunnen hebben op de stamceldynamiek in de aan/afwezigheid van verschillende darmkanker geassocieerde mutaties. Deze drugs zullen wij vervolgens gaan testen in onze muismodellen. Ten eerste zullen wij testen of deze drugs invloed hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen m.b.v. ons controle muismodel. Een week voordat de mutatie+kleurlabel wordt geïnduceerd zullen wij beginnen met het toedienen van de drugs zodat het darmepitheel al in contact is met de drug. De drug zal worden toegediend tot de muizen worden geofferd. Ter controle zullen wij ook drugs testen met soortgelijke werkingsmechanismen als de initiële drugs waarvan we weten dat ze niet als chemopreventieve drugs gebruikt kunnen worden door hun grote hoeveelheid bijwerkingen. De drugs die geen significant effect hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen zullen vervolgens worden getest in onze mutante muismodellen.

Experimenten set 4. Optimale dosis bepalen

Tijdens onze drug screen zullen wij een aantal compounds vinden die de stamceldynamiek van mutante stamcellen zal remmen, zonder een significant effect te hebben op de gezonde darmstamcellen. Van deze

drugs zullen wij vervolgens de optimale dosis gaan bepalen. We willen de dosis vinden waarbij de mutante stamcellen maximaal worden geremd zonder bijwerkingen te veroorzaken in de gezonde stamcellen. De proefopzet zal hetzelfde zijn als de hiervoor beschreven proeven. In het kort: drugs zullen in verschillende doses worden toegediend aan de muizen één week voordat we de mutatie/controlelabel induceren. Drugs zullen in verschillende concentraties blijvend worden toegediend totdat de muizen worden geofferd. De darmen zullen worden geïsoleerd en de stamceldynamiek zal worden gekwantificeerd.

Experimenten set 5. Validatie van de chemopreventieve effecten

Wij hebben nu compounds gevonden die op korte termijn de stamceldynamiek van mutante stamcellen kunnen beïnvloeden. Vervolgens gaan we de chemopreventie effecten van deze compounds valideren om te kijken of er op lange termijn minder tumoren zullen vormen in de darmen van deze muizen. Doordat de dieren tijdens deze experimenten langer in de proef zullen blijven, is de kans groter (dan voorgaand beschreven kortere experimenten) dat deze dieren darmtumoren zullen ontwikkelen.

Het verwachte aantal muizen per experimenten set is hieronder weergegeven:

Experimenten set 1 Stamcel dynamiek bepalen	Experimenten set 2 Organoïde screen	Experimenten set 3 A. Invloed drugs op controle stamcel dynamiek B. Invloed drugs op mutante stamcel dynamiek	Experimenten set 4 Optimale concentratie	Experimenten set 5 Lange termijn validatie
20 muismodellen 8 muizen per model (5 tijdspunten 3 extra controles) 160 muizen	20 muismodellen 3 muizen per model 60 muizen	1 muismodel 8 muizen per model Max 76 drugs 608 muizen 19 muismodellen 8 muizen per model 4 drugs per model (3+1 pos controle) 608 muizen	20 muismodellen 8 muizen per model 1 optimale drug 3 concentraties per drug 480 muizen	20 muismodellen 26 muizen per model 13 met optimale drug concentratie 13 zonder drugs 520 muizen

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.

Alle experimenten moeten leiden tot een beter begrip van het ontstaan van darmkanker, de invloed van darmkanker-gerelateerde mutaties, en hoe wij deze effecten kunnen remmen om zo darmkanker te voorkomen. Om zo dicht mogelijk bij de natuurlijke condities te blijven, hebben wij gekozen om enkel muismodellen te gebruiken. Muismodellen worden al jaren gebruikt om de ontwikkeling darmkanker te modelleren en kunnen vaak direct vertaald worden naar de humane setting. Daarnaast hebben wij gekozen om van deze muismodellen organoïde culturen te kweken. Doordat deze organoïde culturen hun originele 3D structuur en functie behouden kunnen wij *in vitro* een grote drug screen starten. Hierdoor zullen wij sneller weten welke drugs we *in vivo* moeten gaan testen en zal het aantal gebruikte muizen aanzienlijk verminderen. Ten slotte zullen wij compounds hebben getest die voldoen aan de volgende eisen:

- In principe kijk je hoe snel een stamcel met fluorescent label een hele darmcrypt kan overnemen. Tussen controle en behandelde gezonde stamcellen mag géén significant verschil in snelheid van crypt overname gevonden worden (d.m.v. tweezijdige t-test. $P < 0.05$). Wel effect op mutante stamceldynamiek *in vivo*. Echter, pas als er géén negatief effect van de compounds wordt gevonden op de gezonde darmen *in vivo* zullen wij gaan testen of deze compounds wél effect hebben op de mutante darmen *in vivo*. Net als voor de gezonde stamcellen zullen wij ook de stamceldynamiek in mutante stamcellen kwantificeren. In dit geval moeten wij een significante afname in snelheid van crypt overname detecteren in de behandelde mutante stamcellen (d.m.v. tweezijdige t-test. $P < 0.05$). Optimale dosis *in vivo* bepaald met maximale remming mutante stamceldynamiek zonder/minimale bijwerkingen in gezonde darmcellen. Hier zullen wij een aantal concentraties van de drugs testen waarbij de optimale concentratie de mutante stamcellen maximaal remt (hoogste afname en hoogste significante) terwijl de gezonde stamcellen niet worden aangedaan (geen significante afname in crypt overname)

De drugs die aan al deze voorwaarden voldoen zullen worden gevalideerd in een lange termijn proef. We zullen deze drugs in hun optimale concentratie een week voor de inductie van de mutatie/controle toedienen tot we ze offeren tussen de 6-9 maanden, tenzij de muizen hun humane eindpunt eerder hebben bereikt. Op het punt dat we de muizen offeren zullen we de darmen isoleren en het aantal ontstane tumoren bepalen.

Mijlpalen:

- **Experimenten set 1:** Wij zullen voor het eerst de invloed van darmkanker-geassocieerde mutaties op stamceldynamiek kwantificeren. Na onze eerste experimenten set kunnen wij zien of een darmkanker-geassocieerde mutatie wel of geen effect heeft op de stamceldynamiek. Bij geen effect zullen wij experimenten m.b.t. deze mutatie niet voortzetten.
- **Na Experimenten set 5:** De drugs waarvan wij zien dat zij een remmend effect hebben op het ontstaan van darmkanker op lange termijn kunnen verder onderzocht worden en uiteindelijk eventueel in de kliniek worden getest. Om in de kliniek gebruikt te kunnen worden zullen wij voornamelijk drugs testen die al wettelijk zijn goedgekeurd en misschien ook al gebruikt worden (zoals aspirine bijvoorbeeld).

Keuzemomenten:

- **Experimenten set 1:** Als stamcellen met mutaties géén voordeel hebben t.o.v. de gezonde stamcellen zullen wij deze specifieke mutatie niet verder kunnen testen voor experimenten set 2-5.
- **Experimenten set 2:** Als drugs die wij *in vitro* op de organoïde culturen testen niet blijken te werken, zullen wij deze niet testen in onze *in vivo* experimenten set 3. Niet werken houdt in: (1) drug heeft effect op gezonde stamcellen en/of (2) drug heeft geen effect op mutante stamcellen.
- **Experimenten set 3:** Als drugs in de *in vivo* drug screen een negatief effect hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen, zullen wij deze niet verder testen in de mutante darmen.

Als de drugs *in vivo* vervolgens geen of een versnellend effect hebben op de stamceldynamiek van mutante darmen zullen wij niet verder gaan met de experimenten beschreven in experimenten set 4 en 5.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolatie darmen voor organoïde kweek
2	Muismodelmodel voor darmkanker initiatie
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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	Strategieën tegen darmkanker
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Darmkanker, stamcellen, mutaties, chemopreventie

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Darmkanker is de vorm van kanker waaraan de meeste mensen overlijden. In de afgelopen jaren is het duidelijker geworden dat veranderingen (mutaties) in bijzondere cellen in de darm (de stamcellen) de oorzaak zijn voor het ontstaan en uitzaaien van darmkanker. In gezonde darmen zijn de stamcellen verantwoordelijk voor het vervangen van oude "versleten" cellen door nieuwe. We weten nu dat stamcellen die gemuteerd zijn, de gezonde stamcellen langzaam vervangen. We noemen dit de kankerstamcellen. In dit project onderzoeken we waarom deze "kankerstamcellen" succesvoller zijn dan gezonde stamcellen. Het doel is de succesfactor weg te nemen. Op deze manier hopen we te voorkomen dat kankerstamcellen de gezonde stamcellen vervangen en het ontstaan van darmkanker te vertragen. Dit is belangrijk voor mensen die erfelijke of familiäre mutaties hebben en daarom een verhoogde kans hebben op darmkanker.
---	--

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit onderzoek moet duidelijk maken wat de invloed is van mutaties op het gedrag van stamcellen en hoe deze gemuteerde (kanker)stamcellen kunnen worden geremd. Het is van groot belang om te voorkomen dat alle stamcellen worden vervangen door mutante stamcellen. Als wij medicijnen vinden die de voordelen van de mutante stamcellen ten opzichte van de gezonde stamcellen wegnemen, dan zal de kans op het daadwerkelijk ontstaan van darmkanker afnemen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Wij hebben de komende vijf jaar maximaal 2436 muizen nodig
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Wij testen voor dit project medicijnen op muizen om te kijken of ze de gemuteerde kankerstamcellen de pas kunnen afsnijden. De muizen die worden behandeld, ervaren hiervan mogelijk bijwerkingen. Op lange termijn kunnen muizen tumoren ontwikkelen in hun darm en hiervan mogelijk negatieve gevolgen ervaren.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	9 procent van alle muizen zal licht ongerief ervaren. 91 procent van alle muizen zal matig ongerief ervaren door bijwerkingen van de gebruikte medicijnen en tumorgroei in de darm
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Om de darmen te kunnen analyseren, worden de dieren aan het eind van het experiment gedood.

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 dit experiment gebruiken we muizen die gevoelig zijn voor het ontwikkelen van darmkanker. Dit is de meest accurate nabootsing van de menselijke situatie en dit is op dit moment onvervangbaar.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Door statistische methoden te gebruiken kan het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Verder gebruiken wij één muis per tijdspunt, omdat we per muis honderden stamcellen tegelijk kunnen volgen en elke stamcel individueel kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij gebruiken aanzienlijk verminderen door de drugs eerst te testen in het laboratorium. Op deze manier kunnen we een heleboel medicijnen uitsluiten die hoogstwaarschijnlijk in levende proefdieren ook niet werken.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de	We gebruiken voor deze dierproeven uitvoerig geteste genetisch gemodificeerde muizen. Deze hebben de laatste jaren bewezen een nauwkeurige maatstaf te zijn om de dynamiek van stamcellen in de darmen te bestuderen.

doelstellingen van het project.

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

De muizen worden gedurende het experiment regelmatig gemonitord op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Het duidelijk vaststellen en bewaken van humane eindpunten zorgt ervoor dat ernstig ongerief zal worden voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Isolatie darmen voor organoïde kweek

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor het bestuderen van effecten van drugs op stamceldynamiek hebben wij gekozen voor het gebruik van organoïde kweek afkomstig uit de darmen van onze gemodificeerde muismodellen om *in vitro* een drug screen uit te voeren. Deze kweken zullen precies dezelfde celtypen en functies hebben als de darm *in vivo* zou hebben. Door een drug screen eerst *in vitro* te testen kunnen wij al enigszins voorspellen welke drugs er *in vivo* ook daadwerkelijk effect zullen hebben. Hierbij reduceren wij het aantal te gebruiken muizen enorm. De uitkomstparameter van deze dierproef is dan ook een permanente organoïde kweek als resultaat van de darmisolatie.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De muizen zullen onder juiste anesthesie geofferd worden en de darmen worden in het geheel geïsoleerd. Vervolgens zullen de crypten uit de darmen worden gehaald en *in vitro* als organoïde culturen worden gegroeid.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

In principe kunnen wij uit één muizendarm per muismodel een organoïde cultuur starten. Echter, omdat er tijdens de procedure infecties kunnen ontstaan die het maken van de kweek belemmeren vragen wij twee extra muizen per muismodel aan die enkel gebruikt zullen worden wanneer het bij de eerste (of tweede) muis niet is gelukt. Als er eenmaal een organoïde cultuur van een muismodel is opgezet, kunnen deze culturen worden geëxpandeerd en in principe *voor altijd* in kweek worden gehouden, ingevroren worden, en

eventueel ook op een later tijdstip opnieuw worden gebruikt. Dit wil zeggen: Als wij eenmaal de organoïde cultuur hebben opgezet kan deze cultuur voor alle beschreven in vitro experimenten gebruikt worden.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort	Muis
Herkomst	Eigen fok
Geschatte aantal verschillende modellen	20
Geschatte aantal muizen per model	3
Geschatte aantal totale muizen	60
Levensstadium	6-12 weken bij start experiment
Geslacht	m/v

Experimenten set 1	Experimenten set 2	Experimenten set 3	Experimenten set 4	Experimenten set 5
Stamcel dynamiek bepalen	Organoïde screen	A. Invloed drugs op controle stamcel dynamiek	Optimale concentratie	Lange termijn validatie
Zie beschrijving dierproeven 2	20 muismodellen 3 muizen per model 60 muizen	Zie beschrijving dierproeven 2	Zie beschrijving dierproeven 2	Zie beschrijving dierproeven 2

De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. $Apc^{-/fl}$
3. $Apc^{fl/fl}$
4. $Msh2^{-/fl}$
5. $Msh2^{fl/fl}$
6. $LSL-Kras^{G12D}$
7. $LSL-Pik3ca$
8. $PTEN^{fl/fl}$

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Een organoid is een kleine versie van het echte orgaan, maar heeft wel alles wat de grote versie ook heeft. De normale darmwand is niet opgebouwd uit één type cel, maar dat meerdere typen cellen samenwerken om de darmfunctie goed uit te voeren. Vergeleken met het gebruik van dierproefvrije alternatieven, zoals cellijnen afkomstig van één celtype, is het met organoids mogelijk om een compleet beeld van darmproblemen te krijgen. Veel ziektes zijn namelijk niet het probleem van een enkele cel die iets fout doet, maar van een verkeerde samenwerking tussen cellen. Door te kijken naar een 3D-variant waarin alle cellen zich net zo gedragen als in een echte darm, lijkt het al veel meer op de werkelijkheid.

Vermindering: Het gebruik van een organoïde cultuur leidt deels tot een vermindering van het gebruik van onze muismodellen. Wij willen graag zo veel mogelijk drugs testen om uiteindelijk een goede compound te vinden die stamceldynamiek van mutante stamcellen remt, maar de gezonde stamcellen niet negatief beïnvloed. Door al deze compounds eerst *in vitro* te testen op een organoïde kweek kunnen we alvast veel drugs uitsluiten waarvan we voorspellen dat ze geen effect lijken te hebben op de stamceldynamiek. Hierdoor hoeven wij *in vivo* minder drugs te testen, waardoor wij uiteindelijk veel minder muizen nodig hebben.

Verfijning: Om de kans op ongerief voor de muis tot een minimum te beperken zullen we de muizen onder anesthesie brengen alvorens ze geofferd worden. Deze handelingen worden alleen uitgevoerd door ervaren medewerkers. Tevens zullen ook alleen medewerkers met veel ervaring op het gebied van organoïde kweken maken de daadwerkelijke kweken ook opstarten, zodat de kans op het gebruik van meerdere muizen verkleind wordt.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De dieren zullen onder anesthesie (volgens de juiste richtlijnen) geëuthanaseerd worden. De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (en indien nodig DM-II) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.V.T.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Doden onder anesthesie: licht ongerief.

Cumulatief: licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wij zullen de muis moeten doden om zijn darmen te kunnen isoleren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Muismodel voor darmkanker initiatie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Wij hebben gekozen voor het gebruik van muismodellen om de stamceldynamiek van gezonde en mutante stamcellen in de darm te bestuderen. De primaire keuze is gebaseerd op het feit dat wij de normale homeostase van de darm willen bestuderen over tijd, iets wat het makkelijkst kan worden gedaan met een muismodel. De muismodellen die wij ontwikkeld hebben en nog zullen ontwikkelen bevatten de volgende componenten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld Cre^{ERT2})
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

Het experiment zal worden gestart als een eenmalige tamoxifen (en bNF) injectie i.p. wordt toegediend. Door eerdere experimenten weten wij wat de optimale tamoxifen dosis is om ongeveer 1-5% van de stamcellen in de darm van een mutatie + kleurenlabel te voorzien. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken waarbij na toediening van tamoxifen enkel een kleurlabel wordt gegeven aan de stamcellen. Vervolgens kunnen wij over tijd kwantificeren hoe snel deze mutante stamcel de andere gezonde stamcellen in de darmcrypt overneemt. Dit vergelijken wij met de 'normale' snelheid waarmee een normale stamcel andere stamcellen kan vervangen. De snelheid waarmee een darmcrypt volledig gevuld is met een kleurlabel is dan onze primaire uitkomstparameter

Aangezien de darmen van een muis honderdduizenden darmcrypten bevat, kunnen wij in duizenden crypten tegen gelijk onze primaire uitkomstparameter kwantificeren. In principe zullen dus na toevoeging van tamoxifen duizenden mini-experimentjes starten waardoor wij maar 1 muis per tijdspunt hoeven te

Nog een voordeel van het gebruik van een muismodel is dat het vrijwel direct kan worden vertaald naar de humane setting. Dit komt omdat de stamceldynamiek in de muiz vergelijkbaar is met die van een mens.

Alle experimenten zullen de volgende handelingen bevatten (zie ook **figuur 1**):

-
- Test experimenten**
- Start behandeling met drugs
- Tamoxifen (en evt bNF) injectie
- Einde experiment maximaal 60 dagen na I.P. injectie
- 7 dagen
- 60 dagen
- Isoleren darmen op 5 verschillende tijdstippen
- Validatie experimenten**
- Start behandeling met drugs
- Tamoxifen (en evt bNF) injectie
- Einde experiment maximaal 9 maanden na I.P. injectie
- 7 dagen
- 9 maanden

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om het aantal stamcellen per crypt (N), de snelheid waarmee deze stamcellen elkaar vervangen (λ), en de 'replacement bias' (P_R) te bepalen, hebben wij minimaal 5 tijdspunten nodig. Ook hebben wij getest of 3-4 tijdspunten genoeg kan zijn voor onze analyse maar met een CI van 95% konden wij geen accuraat resultaat behalen. Vijf tijdspunten is dus het minimaal aantal tijdspunten dat wij nodig hebben voor een accurate analyse.

Wij zullen naast deze 5 tijds punten nog 1 tijds punt toevoegen aan het eind van het experiment (maximaal 60 dagen na toediening van tamoxifen) om de drift parameters te kunnen valideren door een schatting te maken van het aantal gefixeerde crypten op dat tijds punt met behulp van de eerdere tijds punten. Om te

controleren of de i.p. injectie in alle muizen hetzelfde effect heeft (inter dier variatie) zullen wij per conditie nog twee extra muizen toevoegen die wij op één van de vijf tijdstippen zullen offeren. Dit aantal is genoeg gebleken uit onze eerdere experimenten (), we hoeven op deze manier geen twee muizen per tijdstip te gebruiken om de inter dier variatie te onderzoeken.

Voor de langer durende validatie experimenten willen wij het verschil in aantal tumoren na 6-9 maanden per muismodel kwantificeren. Aan de hand van de literatuur hebben wij een powercalculatie gedaan om het aantal muizen per groep te bepalen. Om 30% verschil in tumor aantallen waar te nemen met een power van 0.8 en een p-waarde van 0.05 hebben wij 13 muizen per conditie per muismodel nodig.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort	Muis
Herkomst	Eigen fok
Geschatte aantal verschillende modellen	20
Geschatte aantal muizen per model	125
Geschatte aantal totale muizen	2376 (figuur 2
Levensstadium	6-12 weken bij start experiment
Geslacht	m/v

Experimenten set 1 Stamcel dynamiek bepalen	Experimenten set 2 Organoïde screen	Experimenten set 3 A. Invloed drugs op controle stamcel dynamiek B. Invloed drugs op mutante stamcel dynamiek	Experimenten set 4 Optimale concentratie	Experimenten set 5 Lange termijn validatie
20 muismodellen 8 muizen per model (5 tijdstippen 3 extra controles) 160 muizen	Zie beschrijving dierproeven 1	1 muismodel 8 muizen per model Max 76 drugs 608 muizen 19 muismodellen 8 muizen per model 4 drugs per model (3+1 pos controle) 608 muizen	20 muismodellen 8 muizen per model 1 optimale drug 3 concentraties per drug 480 muizen	20 muismodellen 26 muizen per model 13 met optimale drug concentratie 13 zonder drugs 520 muizen

De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. Apc^{-/fl}
3. Apc^{fl/fl}
4. Msh2^{-/fl}
5. Msh2^{fl/fl}
6. LSL-Kras^{G12D}
7. LSL-Pik3ca
8. PTEN^{fl/fl}

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het

ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het gebruik van een muismodel voor de initiatie van darmkanker is de meest accurate nabootsing van de complexe menselijke situatie en is daarom op dit moment onvervangbaar. Wél kunnen wij drugs eerst testen op *in vitro* gekweekte organoïde culturen afkomstig van de darmen van de desbetreffende muizen. Alhoewel wij niet alle muizen kunnen vervangen voor organoïde kweken kunnen wij hiermee wel zeker het aantal gebruikte muizen verminderen (zie volgende sectie)

Vermindering: Door goed onderbouwde statistische methoden te gebruiken voorafgaand aan de uitvoering van de experimenten, zal het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Daarnaast zorgt constante evaluatie van de voorgaande experimenten dat er alleen zinvolle vervolg experimenten uitgevoerd zullen worden. Verder gebruiken wij in principe maar een muis per tijdstip, omdat de muizen duizenden crypten bevatten die we in elk individueel dier kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij *in vivo* gebruiken aanzienlijk verminderen door het eerst testen van de drugs *in vitro*. Drugs die *in vitro* al niet werken zullen dan niet onnodig op muizen getest worden.

Verfijning: Voordat drugs aan de dieren gegeven zullen worden, zullen we deze eerste *in vitro* testen, waardoor er niet onnodig veel dieren gebruikt hoeven worden.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De muizen zullen gedurende het hele experiment zorgvuldig gemonitord worden op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Als een muis aan een van de condities voldoet zoals beschreven bij de humane eindpunten, zal deze geëuthanaseerd worden.

De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (of DM-II wanneer nodig) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Dieren kunnen pijn ervaren door injecties met tamoxifen of chemotherapie. Echter deze handeling zal niet langer dan twee seconden duren. Wij vinden daarom het ongerief dat de muis zou ervaren om onder narcose te gaan groter dan het ongerief van de injectie zelf.

Ook kunnen dieren bijwerkingen ervaren van de drugs. Als deze bijwerkingen vaker voorkomen zal de drug niet meer gebruikt worden, deze is dan ook niet geschikt voor een chemopreventie strategie.

Bij de validatie experimenten hopen wij een reductie in tumorgroei te zien bij toediening van een chemopreventie drug. Het is echter niet te uit te sluiten dat er tumoren zullen groeien in (vooral) de controle muizen en de muizen met chemopreventieve drugs. Tumorgroei in de darmen kan leiden tot pijn en hier zullen wij zorgvuldig op controleren (Zie I).

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hanteren en fixeren t.b.v. I.p. injecties (Tamoxifen, bNF) → kortdurende stress

Hanteren en fixeren t.b.v. toeding drugs (chemotherapeutica/ inhibitors) → kortdurende stress

Mogelijke bijwerkingen van de drugs → verminderde eetlust/gewichtsverlies.

Eventuele tumorgroei in de darmen in de lange termijn validatie experimenten → obstipatie/verminderde eetlust/gewichtsverlies/anus prolaps/bloed in faeces.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het gebruik van biologische inhibitors kan leiden tot bijwerkingen omdat niet alleen tumorcellen door deze behandeling worden gedood, maar ook andere snel-delende weefsels hierdoor geraakt kunnen worden.

De validatie-experimenten duren tot maximaal 9 maanden na inductie van de constructen, het is mogelijk dat binnen deze periode tumoren kunnen ontstaan in de darm t.g.v. een geïnduceerde mutatie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Op basis van *in vitro* experimenten, ervaringen uit eerdere *in vivo* experimenten en literatuurgegevens zullen we allereerst een dosis proberen te bepalen. Uiteindelijk willen we een optimale dosis vinden waarbij we een zo laag mogelijke dosering uitvoeren, zodat er slechts een groei-remmend effect op de tumor zal zijn en minimale effecten op gezonde weefsels. Mochten er toch bijwerkingen optreden, zoals gewichtsverlies door verminderde eetlust, zal de dosering aangepast worden, en eventueel zal de voeding worden verrijkt en weekgemaakt.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Gewichtsverlies >15% binnen 2 dagen, OF gedurende een langere periode tov hoogst gemeten gewicht.
Gedragsskenmerken: slechte huidverzorging, kromme houding, op tenen lopen, verminderde mobiliteit, diarree, Mouse Grimace Scale score 3.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

In experimenten set 1 worden geen drugs gebruikt dus hier zullen de muizen geen last van ondervinden. Aangezien de muizen zeer kort (max 60 dagen) in het experiment zitten is de kans op het ontwikkelen van darmkanker zeer klein. Het percentage uitval in deze groep wordt geschat op <5%.

In experimenten set 3 & 4 moet naast een zeer kleine kans op darmkanker formatie (>5%) rekening gehouden worden met bijwerkingen van de toegediende drugs. De effecten van de bijwerkingen zorgvuldig gemonitord zullen worden en de doseringen waar nodig worden aangepast. Het percentage uitval in deze groepen wordt geschat op <10%.

In experimenten set 5 zullen muizen langer in de proef zitten (max 9 maanden na i.p. Tamoxifen/bNF injectie). Deze dieren zullen gedurende het hele experiment drugs toegediend krijgen. Echter zijn deze drugs al getest voor hun optimale concentratie waarbij de minste bijwerkingen zullen optreden. Door de lange duur van het experiment is de kans op het ontstaan van darmkanker aanwezig in de experimentele groep die wél een mutatie heeft maar geen drugs ontvangt. Op basis van ervaring met soortgelijke experimenten verwachten we dat minder dan 10% van deze muizen vanwege een humaan eindpunt geofferd zal moeten worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Beschrijving procedure/procedure	stammen	sex	Aantal dieren	Ongerief (cumulatief)	Ongerief is een combinatie van de volgende procedures
Experimenten set 1	20	m/v	160	160/2376= ~6,8% licht ongerief	Eenmalige I.P. injectie
Experimenten set 3	20	m/v	1216	1216/2376= ~51,2% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs
Experimenten set 4	20	m/v	480	480/2376= ~20,2% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs
Experimenten set 5A: Deze dieren krijgen drugs	20	m/v	260	260/2376= ~10,9% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Deze dieren krijgen drugs toegediend die zijn

toegediend					getest op bijwerkingen. Echter, als de drugs geen effect hebben bestaat er een kans dat deze dieren darmkanker ontwikkelen tijdens het experiment
Experimenten set 5B: Deze dieren krijgen géén drugs toegediend	20	m/v	260	260/2376= ~10,9% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Deze dieren hebben een grote kans om darmkanker te ontwikkelen tijdens het experiment
Total	20	m/v	2376	Licht 6,8% Matig 93,2% Ernstig 0%	

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Aan het einde van het experiment zullen de darmen van de muis geïsoleerd worden. Dit kan alleen door de muis te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project *Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden*
3. Titel van de NTS *Strategieën tegen darmkanker*
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC *DEC-AMC*
 - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken *10 augustus 2017*
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
- Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager nvt
- Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/een wijziging op een bestaande vergunning.~~
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
>nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker). Deze hoofddoelstelling wordt bereikt door het beantwoorden van de volgende onderzoeksvragen:

De aanvragers richten zich vooral op 2 verschillende onderzoeksvragen:

1. *Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?*

2. Kunnen eerder beschreven chemopreventieve medicijnen de normale stamcellen beïnvloeden?
3. Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve medicijnen de mutante kankerstamcellen?
4. Kan er een optimale dosis van deze medicijnen bepaald worden?
5. Kunnen deze medicijnen gebruikt worden om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?

De subvragen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van de onderzoeksgroep [REDACTED]. De personele bezetting en de financiële situatie voorzien verder in de behoeftes aangaande het voorgestelde onderzoek.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
>nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar kankerstamcellen. Tevens wordt er gezocht naar een strategie om de kans op het ontwikkelen van darmkanker te verkleinen. Dit onderzoek zal bijdragen aan een vermeerdering van fundamentele kennis over de kankerstamcelbiologie maar het gebruik van deze kennis in de kliniek zal in de toekomst liggen.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
Het directe doel (het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker in een muizenmodel) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor mensen). Ondanks dat de toepassing van de verkregen kennis uit het voorgestelde onderzoek in de kliniek in de toekomst ligt, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate (toekomstige) patiënten met darmkanker. Muizen zullen worden gedood om organoïden van darmen te kunnen kweken voor het onderzoek. Muizen zullen ook gebruikt worden om de ontwikkeling van darmtumoren te bestuderen en te onderzoeken of medicijnen dit kunnen remmen of voorkomen. De onderzoekers zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op hun

nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere chemopreventieve strategie om het ontwikkelen van darmkanker te voorkómen in mensen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met de beschreven technieken.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project.

Er wordt eerst *in vivo* onderzocht of mutaties in darmstamcellen er voor zorgen dat deze cellen een voordeel hebben om uit te groeien in de darmcrypt ten opzichte van niet-gemuteerde gezonde stamcellen. Indien dit het geval is, wordt in organoïde kweek van darmen onderzocht of medicijnen deze uitgroei van de gemuteerde stamcellen kunnen remmen. Indien dit ook het geval is, zal het medicijn *in vivo* onderzocht worden op de capaciteit om deze uitgroei van mutante cellen te remmen. Vervolgens wordt een optimale dosis bepaald waarbij de mutante cellen geremd worden maar waarbij de gezonde cellen niet aangetast worden. Vervolgens wordt onderzocht of het medicijn in staat is om de ontwikkeling van een darmtumor op lange termijn tegen te houden. De DEC is van mening dat deze onderzoeksstrategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e, lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Het cumulatieve ongerief is geclassificeerd als licht ongerief voor de 60 muizen die gedood zullen worden voor het gebruik van hun darmen voor organoïde kweek. Het cumulatieve ongerief voor de muizen in de *in vivo* tumormodellen is ingeschat als matig. Dit ongerief ontstaat door bijwerkingen van de gebruikte medicijnen en de tumorgroei in de darmen. Echter in de experimenten set 1 worden geen medicijnen gebruikt en is de kans op het ontwikkelen van darmtumoren erg klein. Het ongerief in deze muizen blijft daardoor beperkt tot licht ongerief.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De "heelheid" van het dier wordt aangetast doordat er genetische modificaties plaatsvinden. Er wordt niet verwacht dat hierdoor direct sprake zal zijn van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. De uitgroei van tumoren kan wel leiden tot stress of pijn waardoor het gedrag wordt beïnvloed.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De criteria voor de humaan eindpunten zijn goed gedefinieerd volgens de DEC omdat dieren gedood worden als het lichaamsgewicht meer dan 15% afneemt (zowel in twee dagen als over een langere periode) of doordat ze gedragskenmerken vertonen waaruit blijkt dat ze ernstig ongerief kunnen hebben. De DEC oordeelt dat de HEPs ernstig ongerief ten gevolge van de tumorgroei of de bijwerkingen van de medicijnen zullen voorkomen. De DEC heeft geen reden om te twijfelen aan het geschatte percentage dieren dat hierdoor vroegtijdig uit de proef genomen zal worden, gezien de ervaring van de onderzoekers met dit type onderzoek.

De onderzoekers hebben nog geen ervaring met het percentage dat vroegtijdig uit de

proef genomen wordt door bijwerkingen van de medicijnen. Ze schatten dit even hoog in als het percentage dieren dat door tumorvorming uit de proef genomen kan worden. De DEC is akkoord met deze inschatting omdat de medicijnen eerst in een organoïde kweek onderzocht zijn, waardoor de medicijnen die de gezonde stamcellen te sterk beïnvloeden in dit stadium al afvallen. De DEC ziet in dat het percentage een ruwe maar realistische schatting is.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat het muizenmodel het meest accurate model is voor de complexe menselijke situatie voor de initiatie van darmkanker. Dit kan niet in een proefdiervrij model worden nagebootst.

Gezien de vraagstellingen van dit onderzoek vindt de DEC dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat voor dit type onderzoek een proefdiermodel nodig is en er geen proefdiervrij alternatief voor handen is.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het aantal dieren realistisch is ingeschat op basis van de ervaring van deze groep. Voor de kortdurende experimenten hebben ze maar één muis nodig op zes tijdstippen om de stamceldynamiek in kaart te brengen. Uit ervaring weten ze dat twee extra muizen voldoende zijn om de inter-dier variatie te bepalen.

Voor de langere validatie studies met medicijnen hebben ze een powerberekening gedaan op basis van gegevens uit de literatuur.

De DEC oordeelt dat er met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt doordat er gebruik gemaakt wordt van een statische methode om het dieraantal te bepalen, er duizenden crypten per dier individueel bestudeerd kunnen worden en dat het testen van medicijnen eerst in organoïde kweek plaatsvindt voordat het in dieren onderzocht wordt.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) het onderzoek deels gedaan wordt in organoïde kweken van de darm, deze aanpak bespaart veel ongerief in vergelijking met onderzoek in muizen met tumoren;
- 2) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.
- 3) de gestelde HEPs de dieren zullen beschermen tegen het ondergaan van meer ongerief dan vooraf verwacht.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

nvt

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I* voor voorbeeld).

Er wordt in dit onderzoek in gelijke mate gebruik gemaakt van mannelijke en vrouwelijke dieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood voor onderzoek aan de darmen.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker, het gebruik van 2436 muizen die licht (9.0%) tot matig (91%) ongerief zullen ondergaan in dit onderzoek?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.B*; zie *bijlage I* voor voorbeelden).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie tegen darmkanker, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit mensen die het risico lopen om darmkanker te ontwikkelen doordat ze een bepaalde mutatie hebben. De kennis die

verkregen wordt in dit onderzoek kan op langere termijn bijdragen aan een betere therapie om het ontwikkelen van darmkanker te voorkómen.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze pijn en stress zullen ondergaan als gevolg van tumorvorming en/of bijwerkingen door de onderzochte medicijnen, een kleiner gedeelte van de muizen zal licht ongerief ondergaan doordat ze gedood worden voor het gebruik van hun darmen.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op hun nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op langere termijn een bijdrage leveren aan een betere voorkoming van het ontwikkelen van darmkanker. Genetisch onderzoek wordt in de kliniek gebruikt om aan te tonen dat iemand een verhoogd risico heeft om darmkanker te ontwikkelen. Dit onderzoek voorziet in de behoefte dat er met een preventieve therapie gestart kan worden en zo de ontwikkeling van darmkanker kan worden tegenhouden. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 2436 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 9% licht ongerief en 91% matig ongerief zal ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de stamceldynamiek van stamcellen met een bepaalde mutatie in het ontstaan van darmkanker en hoe met medicijnen (chemo) de uitgroei van deze stamcellen ten opzichte van gezonder stamcellen voorkomen kan worden. De verwachting is dat de inzichten uit dit onderzoek bij kunnen dragen aan een betere strategie om darmkanker te voorkomen in mensen met een mutatie waardoor ze gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van darmkanker. De toepassing van deze inzichten in de kliniek zal echter nog jaren op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de onderliggende stamceldynamiek van stamcellen met mutaties die betrokken zijn bij darmkanker en hoe deze met medicijnen gecontroleerd kunnen worden, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 2436 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Strategieën tegen darmkanker

De DEC is van mening dat het verkrijgen van meer inzicht in de stamceldynamiek van stamcellen met mutaties die betrokken zijn bij het ontstaan van darmkanker alsmede het onderzoeken van strategieën om tumorvorming te voorkomen, het gebruik en het licht (9%) tot matige (91%) ongerief dat 2436 muizen zullen ondergaan in dit onderzoek, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. Er wordt fundamentele kennis verkregen in de stamceldynamiek van gemuteerde stamcellen ten opzichte van gezonde stamcellen met behulp van marker-onafhankelijke labeling strategieën. Dit onderzoek richt zich op het beïnvloeden van deze dynamiek door middel van medicijnen. De aanvrager verwacht dat de resultaten zullen dienen als een "proof-of-principle" voor de humane situatie en daardoor vertaald kunnen worden naar de humane context. Het maatschappelijk belang is duidelijk. Ongeveer 5% van de darmkanker gevallen wordt veroorzaakt door een genetische afwijking. Er is behoefte aan een preventieve strategie om darmkanker te voorkomen in mensen met een verhoogde gevoeligheid. Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden met een specifieke mutatie. In deze muizen wordt bekeken of gemuteerde cellen voordeel hebben om uit te groeien ten opzichte van gezonde stamcellen. Vervolgens zal in een organoïde kweek van darmen onderzocht worden welke medicijnen in staat zijn om dit voordeel weg te nemen bij de gemuteerde cellen. In een in vivo model wordt naar de optimale dosis gezocht waarbij gemuteerde cellen niet meer de overhand nemen maar de gezonde stamcellen. Tenslotte zal het medicijn preventief worden toegediend om te onderzoeken of de tumorvorming langdurig onderdrukt kan worden. Het onderzoeken van het ontstaan van een tumor en het onderdrukken van de uitgroei van gemuteerde stamcellen kan niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd worden, zoals in een cellijn, omdat het een complexe interactie van verschillende celtypes in de darmcrypte structuur van de darm betreft. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar. De verschillende Go/No Go momenten geven duidelijk aan dat de volgende stap in het onderzoek alleen genomen wordt als het voorafgaande onderzoek dit rechtvaardigt. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat het onderzoek waar mogelijk uitgevoerd wordt in organoïde darmkweken. De dieren die hiervoor gebruikt worden ondergaan geen ongerief door experimentele handelingen. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de tumormodellen waardoor de DEC verwacht dat de monitoring op HEPs onverwacht ongerief zal voorkomen.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door een dier zo efficiënt mogelijk te gebruiken voor analyses aan duizenden individuele crypten. Ook zal de aanvrager gebruik maken van statistische methoden om het benodigd aantal dieren te bepalen. Dit onderzoek maakt geen gebruik van bijzondere categorieën dieren of dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

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

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

- C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten...., een acceptabel alternatief is, omdat....."

- C12.Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

- C18.Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

- D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep

mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft.”

Voorbeeld B: “Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan.”

- D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): “De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.”

E. Advies

- E2. Voorbeeld: “Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn.....”



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1180020172125

Bijlagen

2

Datum 1 september 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 augustus 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020172125. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

1 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020172125

Datum:
1 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020172125

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC Duivendrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:

1 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020172125

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: Onderzoeker

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018

Geplande einddatum: 31 december 2022

Titel project: Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden

Titel niet-technische samenvatting: Het ontwikkelen van darmkanker preventie strategieën

Naam DEC: DEC AMC

Postadres DEC: Meibergdreef 31

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 1 september 2017

Datum:
1 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020172125



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ AMSTERDAM


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020172125
Bijlagen
2

Datum 1 september 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 1 september 2017
Vervaldatum: 1 oktober 2017
Factuurnummer: 172125
Ordernummer: Kostenplaats 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020172125	€ 1.187,00

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:47
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD1180020172125: aanhouden beoordelen.

Geachte [REDACTED],

Op 31 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1180020172125. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft in bijlage 3.4.4.2 aan dat er geen pijnbestrijding wordt toegepast, terwijl dieren wel pijn kunnen ondergaan. Voor de injecties is dit voldoende onderbouwd. Uit de aanvraag wordt echter niet duidelijk hoe gehandeld wordt als de dieren pijn ervaren door de groei van de tumoren. U wordt verzocht dit toe te lichten en, indien van toepassing, het niet verstrekken van pijnbestrijding te onderbouwen.

- De 3V's zijn grotendeels geschreven in het kader van vermindering. U geeft echter niet aan waarom geen gebruik gemaakt kan worden van een proefdiervrije methode (bijv. humane cellen) en bij 3.4.4.2. geeft u niet aan hoe aan de eisen van verfijning worden voldaan. Hetzelfde geldt voor de NTS. U wordt verzocht de 3V's op deze punten aan te passen.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

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).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Muismodel voor darmkanker initiatie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Wij hebben gekozen voor het gebruik van muismodellen om de stamceldynamiek van gezonde en mutante stamcellen in de darm te bestuderen. De primaire keuze is gebaseerd op het feit dat wij de normale homeostase van de darm willen bestuderen over tijd, iets wat het makkelijkst kan worden gedaan met een muismodel. De muismodellen die wij ontwikkeld hebben en nog zullen ontwikkelen bevatten de volgende componenten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld Cre^{ERT2})
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

Het experiment zal worden gestart als een eenmalige tamoxifen (en bNF) injectie i.p. wordt toegediend. Door eerdere experimenten weten wij wat de optimale tamoxifen dosis is om ongeveer 1-5% van de stamcellen in de darm van een mutatie + kleurenlabel te voorzien. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken waarbij na toediening van tamoxifen enkel een kleurlabel wordt gegeven aan de stamcellen. Vervolgens kunnen wij over tijd kwantificeren hoe snel deze mutante stamcel de andere gezonde stamcellen in de darmcrypt overneemt. Dit vergelijken wij met de 'normale' snelheid waarmee een normale stamcel andere stamcellen kan vervangen. De snelheid waarmee een darmcrypt volledig gevuld is met een kleurlabel is dan onze primaire uitkomstparameter

Aangezien de darmen van een muis honderdduizenden darmcrypten bevat, kunnen wij in duizenden crypten tegen gelijk onze primaire uitkomstparameter kwantificeren. In principe zullen dus na toevoeging van tamoxifen duizenden mini-experimentjes starten waardoor wij maar 1 muis per tijdspunt hoeven te

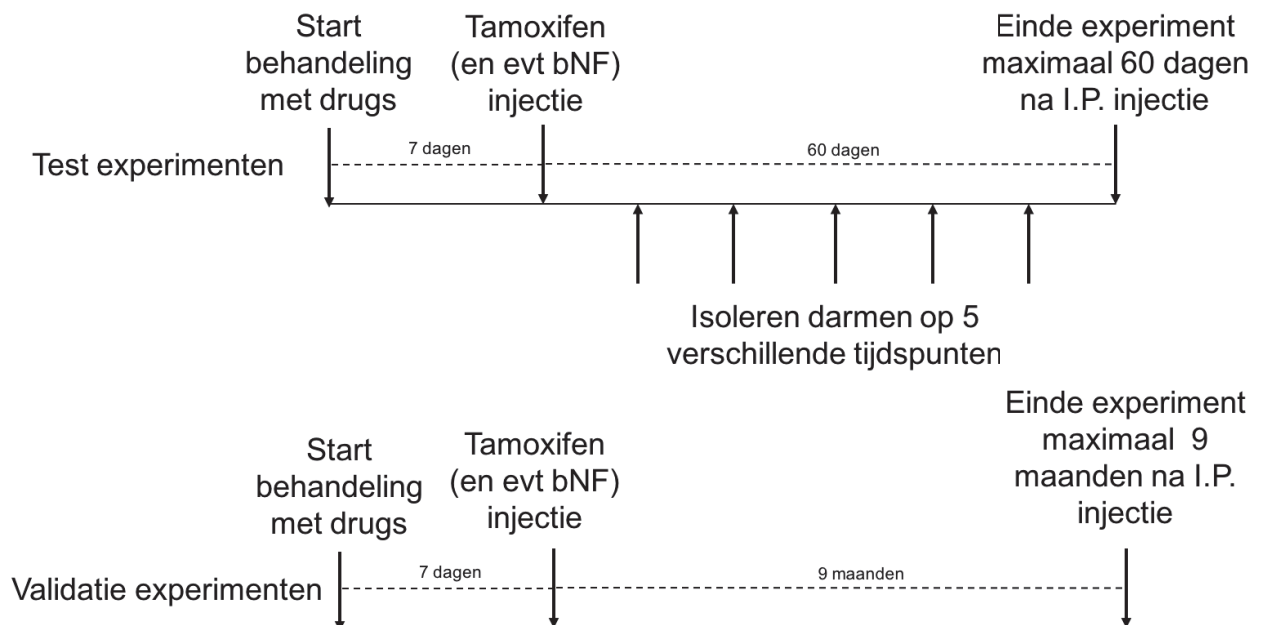
gebruiken.

Nog een voordeel van het gebruik van een muismodel is dat het vrijwel direct kan worden vertaald naar de humane setting. Dit komt omdat de stamceldynamiek in de muizen vergelijkbaar is met die van een mens.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Alle experimenten zullen de volgende handelingen bevatten (zie ook **figuur 1**):

- De muizen zullen eenmalig een i.p. injectie krijgen van 0.15mg tamoxifen (+ 40mg/kg bNF), afhankelijk van de promotor) in 50-100uL zonnebloemolie om het systeem aan te zetten.
- De muizen zullen op 5 verschillende tijdstippen geofferd worden. Vervolgens zullen de darmen van de muizen geïsoleerd worden voor verder onderzoek.
- Als de muizen drugs toegediend krijgen, zal de behandeling gestart worden binnen 1 week vóór de i.p. tamoxifen injectie, en vervolgd worden totdat de muis geofferd wordt. De dosering van de behandeling zal bepaald worden aan de hand van de meest recente literatuurgegevens en pilotexperimenten. De drugs zullen worden toegediend via de volgens literatuur beschreven juiste toedieningsweg die nooit meer dan licht ongerief zal geven. Per muismodel verwachten wij uiteindelijk 3 drugs te testen.
- De kortdurende experimenten zullen maximaal 60 dagen duren na toediening van tamoxifen
- De langdurende validatie experimenten zullen maximaal 9 maanden duren na toediening van tamoxifen. Tijdens deze experimenten kunnen de dieren premaligne darmtumoren ontwikkelen.



Figuur 1. Opzet van de experimenten.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Zoals hierboven beschreven zullen wij voor onze kortdurende experimenten (het kwantificeren van stamceldynamiek en het beïnvloeden van de stamceldynamiek) maar één muis per tijdstip nodig hebben, aangezien we duizenden darmcrypten per muis individueel kunnen bestuderen. Het minimum aantal tijdstippen voor een correcte analyse is eerder bepaald aan de hand van het één-dimensionaal-neutraal-driftmodel (). Om het aantal stamcellen per crypt (N), de snelheid waarmee deze stamcellen elkaar vervangen (λ), en de 'replacement bias' (P_R) te bepalen, hebben wij minimaal 5 tijdstippen nodig. Ook hebben wij getest of 3-4 tijdstippen genoeg kan zijn voor onze analyse maar met een CI van 95% konden wij geen accuraat resultaat behalen. Vijf tijdstippen is dus het minimaal aantal tijdstippen dat wij nodig hebben voor een accurate analyse.

Wij zullen naast deze 5 tijdstippen nog 1 tijdstip toevoegen aan het eind van het experiment (maximaal 60 dagen na toediening van tamoxifen) om de drift parameters te kunnen valideren door een schatting te maken van het aantal gefixeerde crypten op dat tijdstip met behulp van de eerdere tijdstippen. Om te

controleren of de i.p. injectie in alle muizen hetzelfde effect heeft (inter dier variatie) zullen wij per conditie nog twee extra muizen toevoegen die wij op één van de vijf tijdstippen zullen offeren. Dit aantal is genoeg gebleken uit onze eerdere experimenten (), we hoeven op deze manier geen twee muizen per tijdstip te gebruiken om de inter dier variatie te onderzoeken.

Voor de langer durende validatie experimenten willen wij het verschil in aantal tumoren na 6-9 maanden per muismodel kwantificeren. Aan de hand van de literatuur hebben wij een powercalculatie gedaan om het aantal muizen per groep te bepalen. Om 30% verschil in tumor aantallen waar te nemen met een power van 0.8 en een p-waarde van 0.05 hebben wij 13 muizen per conditie per muismodel nodig.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort	Muis
Herkomst	Eigen fok
Geschatte aantal verschillende modellen	20
Geschatte aantal muizen per model	125
Geschatte aantal totale muizen	2376 (figuur 2
Levensstadium	6-12 weken bij start experiment
Geslacht	m/v

Experimenten set 1	Experimenten set 2	Experimenten set 3	Experimenten set 4	Experimenten set 5
Stamcel dynamiek bepalen	Organoïde screen	A. Invloed drugs op controle stamcel dynamiek B. Invloed drugs op mutante stamcel dynamiek	Optimale concentratie	Lange termijn validatie
20 muismodellen 8 muizen per model (5 tijdstippen 3 extra controles) 160 muizen	Zie beschrijving dierproeven 1	1 muismodel 8 muizen per model Max 76 drugs 608 muizen 19 muismodellen 8 muizen per model 4 drugs per model (3+1 pos controle) 608 muizen	20 muismodellen 8 muizen per model 1 optimale drug 3 concentraties per drug 480 muizen	20 muismodellen 26 muizen per model 13 met optimale drug concentratie 13 zonder drugs 520 muizen

De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. $Apc^{-/fl}$
3. $Apc^{fl/fl}$
4. $Msh2^{-/fl}$
5. $Msh2^{fl/fl}$
6. $LSL-Kras^{G12D}$
7. $LSL-Pik3ca$
8. $PTEN^{fl/fl}$

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het

ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het gebruik van een muismodel voor de initiatie van darmkanker is de meest accurate nabootsing van de complexe menselijke situatie en is daarom op dit moment onvervangbaar. Wél kunnen wij drugs eerst testen op *in vitro* gekweekte organoïde culturen afkomstig van de darmen van de desbetreffende muizen. Alhoewel wij niet alle muizen kunnen vervangen voor organoïde kweken kunnen wij hiermee wel zeker het aantal gebruikte muizen verminderen (zie volgende sectie). Het volledig vervangen van muismodellen door een proefdier-vrij alternatief zoals bijvoorbeeld humane cellijnen is helaas onmogelijk omdat wij kijken naar weefseldynamiek (de interactie tussen verschillende cellen en celtypen) en deze is niet na te bootsen in een cellijn setting.

Vermindering: Door goed onderbouwde statistische methoden te gebruiken voorafgaand aan de uitvoering van de experimenten, zal het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Daarnaast zorgt constante evaluatie van de voorgaande experimenten dat er alleen zinvolle vervolg experimenten uitgevoerd zullen worden. Verder gebruiken wij in principe maar een muis per tijdstip, omdat de muizen duizenden crypten bevatten die we in elk individueel dier kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij *in vivo* gebruiken aanzienlijk verminderen door het eerst testen van de drugs *in vitro*. Drugs die *in vitro* al niet werken zullen dan niet onnodig op muizen getest worden.

Verfijning: Voordat drugs aan de dieren gegeven zullen worden, zullen we deze eerste *in vitro* testen, waardoor er niet onnodig veel dieren gebruikt hoeven worden. Tevens zijn onze muismodellen zodanig ontwikkeld en verfijnd dat wij alleen naar dynamiek kijken in vroeg stadium tumor ontwikkeling. Door deze premaligne tumor ontwikkeling zullen onze muizen vrijwel geen ongerief ondervinden.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De muizen zullen gedurende het hele experiment zorgvuldig gemonitord worden op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Als een muis aan een van de condities voldoet zoals beschreven bij de humane eindpunten, zal deze geëuthanaseerd worden.

De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (of DM-II wanneer nodig) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Dieren kunnen pijn ervaren door injecties met tamoxifen of chemotherapie. Echter deze handeling zal niet langer dan twee seconden duren. Wij vinden daarom het ongerief dat de muis zou ervaren om onder narcose te gaan groter dan het ongerief van de injectie zelf.

Ook kunnen dieren bijwerkingen ervaren van de drugs. Als deze bijwerkingen vaker voorkomen zal de drug niet meer gebruikt worden, deze is dan ook niet geschikt voor een chemopreventie strategie.

Bij de validatie experimenten hopen wij een reductie in tumorgroei te zien bij toediening van een chemopreventie drug. De tumoren die kunnen groeien door het aanzetten van mutaties in onze muismodellen zullen alleen van premaligne aard zijn. Het is echter niet uit te sluiten dat er premaligne tumoren zullen groeien in (vooral) de controle muizen en de muizen met chemopreventieve drugs. Uit ervaring lijkt deze premaligne tumorgroei in de darmen vrijwel nooit tot pijn. Indien er toch aanwijzingen zijn dat de dieren wel pijn/ongemak ondervinden (prolaps, anemie, veranderd gedrag, gewichtsverlies, etc Zie I); nemen we de dieren uit de proef.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hanteren en fixeren t.b.v. I.p. injecties (Tamoxifen, bNF) → kortdurende stress

Hanteren en fixeren t.b.v. toeding drugs (chemotherapeutica/ inhibitors) → kortdurende stress

Mogelijke bijwerkingen van de drugs → verminderde eetlust/gewichtsverlies.
Eventuele premaligne tumorgroei in de darmen in de lange termijn validatie experimenten → obstipatie/verminderde eetlust/gewichtsverlies/anus prolaps/bloed in faeces.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het gebruik van biologische inhibitors kan leiden tot bijwerkingen omdat niet alleen tumorcellen door deze behandeling worden gedood, maar ook andere snel-delende weefsels hierdoor geraakt kunnen worden. De validatie-experimenten duren tot maximaal 9 maanden na inductie van de constructen, het is mogelijk dat binnen deze periode premaligne tumoren kunnen ontstaan in de darm t.g.v. een geïnduceerde mutatie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Op basis van *in vitro* experimenten, ervaringen uit eerdere *in vivo* experimenten en literatuurgegevens zullen we allereerst een dosis proberen te bepalen. Uiteindelijk willen we een optimale dosis vinden waarbij we een zo laag mogelijke dosering uitvoeren, zodat er slechts een groei-remmend effect op de tumor zal zijn en minimale effecten op gezonde weefsels. Mochten er toch bijwerkingen optreden, zoals gewichtsverlies door verminderde eetlust, zal de dosering aangepast worden, en eventueel zal de voeding worden verrijkt en weekgemaakt.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Gewichtsverlies >15% binnen 2 dagen, OF gedurende een langere periode tov hoogst gemeten gewicht. Gedragskenmerken: slechte huidverzorging, kromme houding, op tenen lopen, verminderde mobiliteit, diarree, Mouse Grimace Scale score 3.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

In experimenten set 1 worden geen drugs gebruikt dus hier zullen de muizen geen last van ondervinden. Aangezien de muizen zeer kort (max 60 dagen) in het experiment zitten is de kans op het ontwikkelen van darmkanker zeer klein. Het percentage uitval in deze groep wordt geschat op <5%.

In experimenten set 3 & 4 moet naast een zeer kleine kans op darmkanker formatie (>5%) rekening gehouden worden met bijwerkingen van de toegediende drugs. De effecten van de bijwerkingen zorgvuldig gemonitord zullen worden en de doseringen waar nodig worden aangepast. Het percentage uitval in deze groepen wordt geschat op <10%.

In experimenten set 5 zullen muizen langer in de proef zitten (max 9 maanden na i.p. Tamoxifen/bNF injectie). Deze dieren zullen gedurende het hele experiment drugs toegediend krijgen. Echter zijn deze drugs al getest voor hun optimale concentratie waarbij de minste bijwerkingen zullen optreden. Door de lange duur van het experiment is de kans op het ontstaan van premaligne darmkanker aanwezig in de experimentele groep die wél een mutatie heeft maar geen drugs ontvangt. Op basis van ervaring met soortgelijke experimenten verwachten we dat minder dan 10% van deze muizen vanwege een humaan eindpunt geofferd zal moeten worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Beschrijving procedure/procedure	stamme n	sex e	Aantal dieren	Ongerief (cumulatief)	Ongerief is een combinatie van de volgende procedures
Experimenten set 1	20	m/v	160	160/2376= ~6,8% licht ongerief	Eenmalige I.P. injectie
Experimenten set 3	20	m/v	1216	1216/2376= ~51,2% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Toediening +

					Bijwerkingen van drugs
Experimenten set 4	20	m/v	480	480/2376= ~20,2% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs
Experimenten set 5A: Deze dieren krijgen drugs toegediend	20	m/v	260	260/2376= ~10,9% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Deze dieren krijgen drugs toegediend die zijn getest op bijwerkingen. Echter, als de drugs geen effect hebben bestaat er een kans dat deze dieren premaligne darmkanker ontwikkelen tijdens het experiment
Experimenten set 5B: Deze dieren krijgen géén drugs toegediend	20	m/v	260	260/2376= ~10,9% matig ongerief	Eenmalige I.P. injectie Deze dieren hebben een grote kans om premaligne darmkanker te ontwikkelen tijdens het experiment
Total	20	m/v	2376	Licht 6,8% Matig 93,2% Ernstig 0%	

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Aan het einde van het experiment zullen de darmen van de muis geïsoleerd worden. Dit kan alleen door de muis te doden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM
|||||

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020172125
Bijlagen
1

Datum 28 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" met aanvraagnummer AVD1180020172125. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u vragen gesteld over het gebruik van pijnbestrijding en de 3V's. U heeft als antwoord een aangepaste bijlage dierproeven en een aangepaste NTS ingediend. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel

10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

28 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020172125

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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

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).



Datum:
28 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020172125

Bijlagen:

- Vergunning
- 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: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" met aanvraagnummer AVD1180020172125, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 augustus 2017, ontvangen op 31 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Isolatie darmen voor organoïde kweek				
	Muizen (Mus musculus) /	60	100% Licht	
3.4.4.2. Muismodel voor darmkanker initiatie				
	Muizen (Mus musculus) /	2.376	93% Matig 7% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Aanvraagnummer:
AVD1180020172125

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1180020172125

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 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 voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD1180020172125

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 blijven 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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling/ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.