

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk **7 werkdagen** voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven op Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

[REDACTED]

[REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

telefoon: [REDACTED] / fax: [REDACTED]

Kerngebied en locatie: TNO [REDACTED]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel:

Implementatie van pijn metingen voor rat artrose (vervolgstudie op DEC 2341)

1.2. studienummer:

nvt

1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

nvt

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD):

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

[REDACTED] heeft geadviseerd over de te implementeren pijn analyses die relevant zijn voor artrose en is half augustus in Nederland geweest om de medewerkers te trainen in de metingen en achterliggende theorie/procedures.

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan:

z.s.m. na goedkeuring DEC

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [REDACTED])

Geplande duur van de onderzoeksplan:

6 maanden

Locatie waar dieren worden gehouden:

TNO [REDACTED]

[REDACTED]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	02	1	8	03	1	1	01	01	4	4	3	1
2	1	02	1	8	03	1	1	01	01	4	4	3	1
3	1	02	1	8	03	1	1	01	01	4	4	3	1
4	1	02	1	8	03	1	1	01	01	4	4	3	1

Groep 1: unilaterale MIA – verder valideren incapacitance

Groep 2: unilaterale MIA – von Frey hair mechanical allodynia implementeren, icm registratie US vocalisatie

Groep 3: unilaterale MIA – thermische allodynia implementeren

Groep 4: unilaterale MIA – Laboras bewegings meting

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

Implementatie van relevante standaard pijn metingen in rat MIA artrose model

Achtergrond: Artrose (het engelse osteoarthritis of OA) of kraakbeenslijtage is één van de meest voorkomende ouderdomsaandoeningen. Tien procent van de 60-plussers heeft chronische pijn en gewrichtsdeformaties vanwege OA en is daardoor ernstig gehinderd in het dagelijks functioneren. De farmaceutische industrie heeft zich lang alleen maar gericht op het ontwikkelen van medicijnen die weefselafbraak (karakteristiek voor artrose) tegengaan. Mede onder druk van de FDA en patiëntenorganisaties is de aandacht de laatste jaren verschoven en wordt symptoom-, en dus pijnbestrijding ook erg belangrijk. Hiertoe moeten de bestaande diermodellen voor artrose uitgebreid worden met uitleesmaten die specifiek zijn voor gewrichtspijn door artrose.

In DEC2341 hebben we hiertoe een eerste stap gezet. De bedoeling van die studie (DEC2341) was om in twee complementaire ratten artrose modellen (het mono sodium iodoacetaat model (MIA) en het meniscectomie/ACL transectie (MNX/ACLT) model) drie pijn metingen te implementeren. Zoals overlegd met de proefdierdeskundige bleek dat niet haalbaar te zijn, omdat [1] de ratten te zwaar waren voor de von Frey hair test apparatuur, [2] de thermische allodynia test apparatuur te gevoelig was en [3] de metingen erg arbeidsintensief zijn. De studie design is i.o.m. de proefdierdeskundige aangepast en in DEC2341 is alleen incapacitance gemeten. De resultaten hiervan zijn veelbelovend. Gezonde ratten belasten hun achterpoten ongeveer gelijk. Na unilaterale inductie van artrose (beide modellen) verschuift de gewichtsverdeling; de artrose poot wordt ontlast. Behandeling met buprenorphine normaliseert dit ten dele.

Op grond van deze veelbelovende resultaten willen we in de huidige aanvraag in 4 losse, ten dele parallel lopende experimenten, de drie andere, relevante pijn maten ook implementeren (mechanische allodynia, thermische allodynia, beweging/loop gedrag) en de incapacitance meting verder valideren. Daarnaast zal ook ultrasone vocalisatie gemeten worden i.s.m. [REDACTED].

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier

Artrose (het engelse osteoarthritis of OA) of kraakbeenslijtage is één van de meest voorkomende ouderdomsaandoeningen. Tien procent van de 60-plussers heeft chronische pijn en gewrichtsdeformaties vanwege OA en is daardoor ernstig gehinderd in het dagelijks functioneren. Mede door de vergrijzing zal het aantal patiënten de komende jaren sterk groeien. Helaas is er momenteel geen geneesmiddel beschikbaar tegen OA en patiënten worden voornamelijk behandeld met generieke pijnstillers, hoewel het onduidelijk is wat de artrose pijn veroorzaakt en veel van de pijnstillers bij chronisch gebruik bijwerkingen vertonen. OA staat hierdoor in de top-5 van kosten voor de gezondheidszorg in Europa. Er is dus zowel vanuit patiënten als vanuit economisch perspectief een grote behoefte aan nieuwe geneesmiddelen die kraakbeenslijtage afremmen dan wel genezen en die de symptomen (pijn, bewegingsbeperking) verminderen. In dit kader wordt artrose in het WHO rapport over 'Priority Medicine' ook specifiek benoemd als ziekte waarvoor het ontwikkelen van biomarkers en therapieën essentieel is.

6.a.2 Economisch belang

Het chronische karakter van de ziekte, de toenemende mate van invaliditeit en het ontbreken van enige therapie (m.u.v. pijnstilling) maakt OA een ziekte die relatief hoge kosten met zich meebrengt, die uiteenvallen in de directe medische kosten en daarnaast de indirecte kosten als gevolg van (gedeeltelijke) arbeidsongeschiktheid. De 'Bone and Joint Decade' (een WHO initiatief om de kwaliteit van leven van mensen met aandoeningen aan het bewegingsapparaat te verbeteren) geeft aan dat: '...The economic consequences of osteoarthritis are enormous, for example, it is rated the highest cause of work loss in USA, despite being a condition that causes most problems to populations after retirement age...'

6.a.3 Milieu belang

nvt

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

Het chronische progressieve karakter van de ziekte is in toenemende mate belastend (zowel fysiek als psychisch) voor zowel patiënt als directe omgeving (familie/verzorgers).

6.b Wetenschappelijk belang:

In de laatste tien jaar heeft TNO Kwaliteit van Leven in haar business unit BioSciences grote expertise opgebouwd op een aantal ziektegebieden, waaronder gewrichtsaandoeningen (artrose en reuma), fibrose, hart- en vaatziekten, ontstekingsziekten en neurologische aandoeningen. Deze kennis is mede gestoeld op een groot aantal *in vitro* en *in vivo* ziektemodellen, die momenteel worden toegepast om ziektemechanismen op te helderen en biomarkers te identificeren, om geneesmiddelen te testen in samenwerking met farmaceutische en biotechnologie bedrijven, om voedingsinterventies te testen in samenwerking met bedrijven, en om onze eigen ziekte targets te ontwikkelen en patenteren. De huidige studie valt in dit kader binnen de ontwikkeling van nieuwe meet-methodes in diermodellen voor artrose en is een vervolg studie op DEC 2341.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld? Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

De onderzoekslijn is getoetst op wetenschappelijke kwaliteit tijdens overleg tussen projectleiders / senior onderzoekers binnen TNO, besproken met [REDACTED] en besproken met vertegenwoordigers van farmaceutische bedrijven.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):

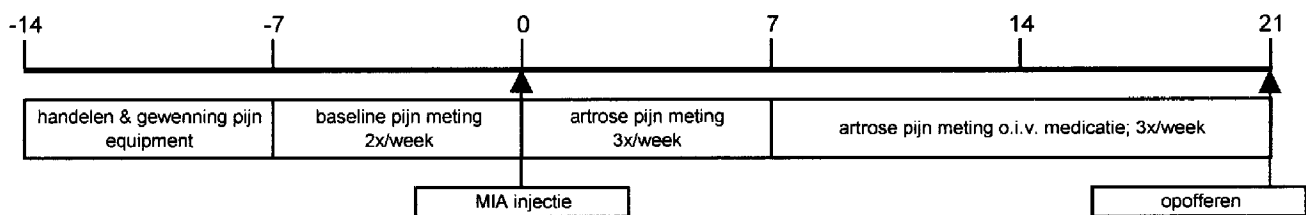
- nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
testrichtlijn:
- proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaard studieplan voor de nadere uitwerking.

De studie zal in 4 (gedeeltelijk overlappende) losse experimenten uitgevoerd worden. Elk experiment maakt gebruik van 8 ratten. De vier experimenten verschillen in de pijnmeting die gedaan wordt.

In het tijdschema hieronder wordt één experiment grafisch weergegeven. Deze aanpak geldt voor experiment 1 (incapacitance), experiment 2 (von frey hair) en experiment 3 (thermische allodynia). Het vierde experiment is apart beschreven omdat de Laboras apparatuur een andere opzet nodig maakt.



Experimenten 1, 2 en 3

- Op dag -14 komen de mannelijke Wistar ratten (5 weken oud) binnen.
- Vanaf binnenkomst tot dag -7 worden de ratten gehandeld, zodat ze gewend zijn aan de omgeving en stallen en op werkdagen dagelijks kort op de pijnmeting apparatuur geplaatst om ook hier aan te wennen
- Experimentele groepen:
 - Experiment 1 = incapacitance meting
 - Experiment 2 = von Frey hair mechanische allodynia
 - Experiment 3 = thermische allodynia
- Tussen dag -7 en de dag van de inductie van artrose (dag 0) worden alle ratten gehandeld en worden 2x baseline pijnmetingen uitgevoerd. Dit wordt gedaan om enerzijds baseline

pijnmetingen te verkrijgen, anderzijds worden hiermee tegelijkertijd de medewerkers getraind in het uitvoeren van deze metingen.

- Op dag 0 wordt de transponderchip onderhuids ingebracht onder isofluraan anesthesie en artrose wordt geïnduceerd in alle ratten door een éénmalige unilaterale intra-articulaire injectie van 50 µl fysiologisch zout met daarin 3 mg mono-natrium iodoacetaat. De contralaterale controle knie krijgt een intra-articulaire injectie van alleen 50 µl fysiologisch zout. Post operatief wordt eenmaal buprenorphine gegeven (s.c. 0.05 mg/kg; 100 ul)
- Vanaf dag 0 tot dag 7 wordt met alle ratten **3x per week** de pijnmeting uitgevoerd.
- Vanaf dag 8 (tweede en derde week na MIA injectie) wordt het effect van verschillende analgetica getest in de volgende set-up.
 - Maandag training pijnmeting
 - Dinsdag training pijnmeting
 - Woensdag op t = -2 uur: baseline pijn meting
 - Woensdag op t = 0 uur: dosering met test compound 1
 - Woensdag op t= 1, 2, 3, 4, en 6 uur: pijn meting
 - Donderdag op t= 24 uur = -2 uur baseline pijn meting
 - Donderdag op t = 0 uur: dosering met test compound 2
 - Donderdag op t= 1, 2, 3, 4, en 6 uur: pijn meting
 - Vrijdag op t= 24 uur = -2 uur: baseline pijn meting
 - Vrijdag op t = 0 uur: dosering met test compound 3
 - Vrijdag op t= 1, 2, 3, 4, en 6 uur: pijn meting
- Dit schema wordt in de derde week herhaald met compound 4 t/m 6.
- Op dag 21 worden alle ratten opgeofferd (CO₂) en worden weefsels (gewrichten), gewrichtsvloeistof, serum en plasma opgeslagen voor macroscopische, histologische en biomarker analyses.

Experiment 4

- Op dag -14 komen de mannelijke Wistar ratten (5 weken oud) binnen.
- Vanaf binnenkomst tot dag -7 worden de ratten gehandeld, zodat ze gewend zijn aan de omgeving en stallen
- Experimentele groepen:
 - Experiment 4 = Laboras bewegings meting
- Tussen dag -7 en de dag van de inductie van artrose (dag 0) worden alle ratten gehandeld en worden 2x baseline pijnmetingen uitgevoerd door de ratten overnacht, individueel op de Laboras apparatuur te zetten en gedurende 16 uur loopafstand, snelheid, versnelling te meten. Dit wordt gedaan om baseline metingen te verkrijgen en de ratten te laten wennen aan de opstelling.
- Op dag 0 wordt de transponderchip onderhuids ingebracht onder isofluraan anesthesie en artrose wordt geïnduceerd in alle ratten door een éénmalige unilaterale intra-articulaire injectie van 50 µl fysiologisch zout met daarin 3 mg mono-natrium iodoacetaat. De contralaterale controle knie krijgt een intra-articulaire injectie van alleen 50 µl fysiologisch zout. Post operatief wordt eenmaal buprenorphine gegeven (s.c. 0.05 mg/kg)
- Vanaf dag 0 tot dag 7 wordt met alle ratten **4x per week (ma-di nacht, di-wo nacht, wo-do nacht en do-vr nacht)** de laboras meting uitgevoerd.
- Vanaf dag 8 (tweede en derde week na MIA injectie) wordt het effect van verschillende analgetica getest in de volgende set-up.
 - Ma-Di nacht baseline pijnmeting
 - Dinsdag 17.00 uur dosering met test compound 1

- Di-Wo nacht pijnmeting
- Woensdag 17.00 uur test compound 2
- Wo-Do nacht pijnmeting
- Donderdag 17.00 uur test compound 3
- Do-Vr nacht pijnmeting
- Dit schema wordt in de derde week herhaald met compounds 4 t/m 6.
- Op dag 21 worden alle ratten opgeofferd (CO₂) en worden weefsels (gewrichten), gewrichtsvloeistof, serum en plasma opgeslagen voor macroscopische, histologische en biomarker analyses.

De te gebruiken test compounds zijn gekozen op grond van literatuur waarin ze effectiviteit laten zijn in onderdrukking van artrose pijn. Er zijn verschillende compounds gekozen omdat deze compounds de verschillende pijn uitleesmaten op met verschillende efficiëntie onderdrukken.

1. morphine sulphate,	3 mg/kg	in 0.9% NaCl	s.c.	(Beyreuther 2007)
2. tramadol,	100 mg/kg	in 0.9% NaCl	p.o.	(Combe 2004)
3. diclofenac	30 mg/kg	in 0.9% NaCl	s.c.	(Beyreuther 2007)
4. paracetamol	100 mg/kg	in 1% HPMC	p.o.	(Staton 2007)
5. gabapentin	100 mg/kg	in 1% HPMC	p.o.	(Bove 20-06)
6. lacosamine	30 mg/kg	in 0.9% NaCl	s.c.	(Beyreuther 2007)

Doserings volume is in alle gevallen 0.5 ml

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
Groep 1	Zie punt 9; alle behandelingen en biotechnische handelingen worden daar puntsgewijs beschreven.		8	M
Groep 2	Zie punt 9; alle behandelingen en biotechnische handelingen worden daar puntsgewijs beschreven.		8	M
Groep 3	Zie punt 9; alle behandelingen en biotechnische handelingen worden daar puntsgewijs beschreven.		8	M
Groep 4	Zie punt 9; alle behandelingen en biotechnische handelingen worden daar puntsgewijs beschreven.		8	M

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard studieplan: Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

Totaal **32 ratten** in 4 experimentele groepen van elk 8 ratten.

Dit is het vervolg onderzoek op DEC 2341. In die studie hebben we 12 ratten per groep gebruikt n.a.v een literatuur studie die qua opzet goed leek op onze studie (Beyreuther et al). In de literatuur zijn andere artikelen met groepen met tussen 4 en 14 dieren. Op grond van onze opgedane ervaring met de incapacitance metingen (binnen DEC2341) is 8 dieren per groep momenteel het maximaal haalbare om de arbeidsintensieve metingen betrouwbaar uit te kunnen voeren. Daarom willen we voor de huidige studie 8 ratten per groep gebruiken.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificieer bij vraag 8.

5 weken oude manlijke Wistar ratten – deze stam wordt in de literatuur meestal gebruikt voor artrose modellen. De ratten komen van Harlan of Charles River. De ratten moeten bij binnenkomst 5 weken oud zijn omdat ze niet te groot en zwaar mogen zijn gedurende de studie, met name ivm de maximale druk weerstand die de von Frey hair apparatuur kan leveren.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- aangekocht van proefdierfokker
- aangekocht elders, n.l.:
- overcomplete dieren
- eigen fok
- reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- euthanasie ten behoeve van de proef
- euthanasie na afloop van de proef
- gebruik voor een volgende proef
- andere vergunninghouder
- anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Type 3 bakken met 2 ratten per bak (ratten voor experiment 4 worden individueel gehuisvest omdat ze frequent overnacht individueel op de Laboras apparatuur geplaatst worden en we niet het risico willen lopen dat de mannetjes ratten steeds een nieuwe hiërarchie moeten vinden (bijbehorende stress interfereert met pijn metingen/gedrag)

Voedsel (Ssniff; Bio-services) en water (pH 2,8) ad libitum

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd **per handeling** of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

Groep ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1-4	32	Pijnmetingen van dag -14 tot dag 21. Let op: i.t.t. artritische modellen hebben artrose ratten geen ontstoken/gezwellen pootjes en lopen ze normaal, waarbij ongerief door pijnmetingen aan poot als gering/matig (mede in overleg met proefdier deskundige) wordt gezien	Vijf weken lang, bijna dagelijks	2
1-4	32	Artrose start door iodoacetaat injectie in gewricht onder isofluraan anesthesie met één keer buprenorphine	Dag 0	3

		pijnstilling en transponderchip inbrengen.		
1-4	32	Artrose ontwikkeling	Dag 0 tot 21	3
1-4	32	compound dosering	6x gedurende de studie	2
4	8	Individuele huisvesting	gehele studie (5 weken)	2
1-4	32	Euthanasie (CO ₂)	Dag 21	1

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandelings-effect.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
Code 6: zeer ernstig
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-4	32	3

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Uit literatuur en voorgaande studies met ratten en cavia's weten we dat veel artrose modellen niet tot (visuele waarneembare) pijn a.g.v. de artrose leidt. Echter het hier gebruikte iodoacetaat model is wel beschreven als een model waarin naast de ontwikkeling van artrose ook naar gedrag in relatie tot pijn gekeken kan worden. Dat is ook de bedoeling van de huidige studie. Daarbij is het essentieel dat het effect van in de literatuur beschreven pijnstillers kan worden gemeten. Vanwege deze proefopzet is pijnstilling gedurende de gehele studie onvermijdelijk met de opzet van de studie. Wel wordt post-operatief 2x pijnstilling gegeven.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Dieren worden continue beoordeeld op algemeen welbevinden en mobiliteit. Indien de mobiliteit achteruit (dit wordt niet verwacht op grond van voorgaande artrose experimenten) gaat zal aandacht besteedt worden aan verkrijgen van voldoende voedsel / drinken. Dieren worden uit de proef genomen bij meer dan 15% verlies aan lichaamsgewicht a.g.v. de ziekte (op individuele basis)

20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Onwaarschijnlijk. De modellen zijn goed beschreven en complicaties op grond van de ziekte zijn niet te verwachten.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel *in vivo* als *in vitro*, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

- **Vervanging:** Er zijn geen geschikte alternatieven voor het diermodel voorhanden omdat pijn metingen een levend organisme vereisen.
- **Vermindering** van het aantal proefdieren in deze studie is moeilijk. Formele power berekeningen moeilijk zijn in artrose modellen omdat er geen gevalideerde therapie is en omdat er te weinig informatie is over de spreiding in uitkomst maten. Bij de power berekening / verantwoording van aantal dieren, is aangegeven dat we nu dezelfde groepsgrootte aanhouden als een gepubliceerde studie. Op grond van onze eigen gegevens kunnen we in de toekomst zelf power berekeningen gaan doen. In de vorige studie hebben we 12 dieren per groep gebruikt. Om praktische redenen willen we nu 8 ratten gebruiken per groep (wordt ook in de literatuur soms gedaan). Ik verwacht dat we pas over een aantal studies een indruk kunnen krijgen wat het optimale aantal ratten per groep is. In de huidige studie is het niet mogelijk het aantal groepen te verminderen.
- **Verfijning** is zou in de huidige studie betekenen dat we met minder ongerief de artrose induceren. Dat lijkt niet mogelijk omdat de i.a. injectie al minimaal invasief wordt uitgevoerd. Ook zouden de pijn metingen met minder ongerief uitgevoerd moeten worden om verfijning te bewerkstelligen. Dat lijkt vooralsnog ook niet mogelijk (er worden standaard methoden gebruikt die zelf weinig ongerief met zich meebrengen).

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

In de studie zal een pilot meelopen om ultrasone vocalisatie non-invasief te monitoren. Voor deze meting is trouwens wel een prikkel nodig. Daarom zal de vocalisatie gemeten worden tegelijk met de von frey hair of thermische allodynia test.

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

- TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- Art. 14 functionaris ([REDACTED], tel [REDACTED])
- Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- elders, n.l.:

● zo nee; waarom niet:

Het cluster [REDACTED] heeft een jarenlange expertise op gebied van artrose en artritis onderzoek en de daarbij gebruikte diermodellen. Voor het huidige experiment dat juist bedoeld is om additionele metingen te implementeren in *in vivo* artrose modellen in de rat, en is een alternatief dus niet beschikbaar.

ANDERE ASPEKTEN

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

nvt

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

OA = artrose



onderzoeker

Management

datum:

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker.