

## 1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Ontrafelen van de verschillen tussen mannen en vrouwen in reumatische pijn: rol van geslachtshormonen en TLR4
1.2	Looptijd van het project	1-9-2019-1-9-2024
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	pijn, gender, TLR4, artritis, artrose

## 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 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Feitelijk gezien ervaren vrouwen vaker (chronische) pijnklachten dan mannen. Ondanks dit feit zijn de meeste onderzoeken naar pijnklachten en pijnmedicatie gericht op mannen en zijn de proefdieren die bij deze onderzoeken worden gebruikt louter mannelijk. Het is niet duidelijk waarom vrouwen meer pijn ervaren dan mannen. Er zijn aanwijzingen dat het verschil mogelijk ligt in het al dan niet gebruiken van het signaalmolecuul TLR4, waardoor er een verschil is in het verwerken van het pijnsignaal.</p> <p>TLR4 is een zogenaamde receptor, een molecuul op het membraan van een cel. Dit molecuul vangt signalen uit de omgeving op en geeft deze door aan de cel, waarop de cel vervolgens reageert. TLR4 is belangrijk bij het doorgeven van signalen tijdens immuunreacties en speelt daarmee een grote rol in verschillende vormen van reumatische aandoeningen. Het is tot nu toe onbekend of het ook belangrijk is voor het verschil in pijnsignalen tussen mannen en vrouwen bij reumatische aandoeningen.</p> <p>Onze doelstellingen zijn dan ook:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) vaststellen of er verschillen zijn in pijn tussen mannen en vrouwen en of deze verschillen gelden voor specifieke of voor alle gebruikte experimentele modellen voor (osteo)arthritis</li><li>2) vaststellen of TLR4 hier een rol in speelt</li><li>3) vaststellen of geslachtshormonen, zoals oestrogenen, progestagenen en androgenen hier een rol in spelen</li><li>4) vaststellen of geslachtshormonen de rol van TLR4 in pijn in deze modellen voor (osteo)arthritis kunnen beïnvloeden</li></ol>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Aan het eind van dit project verwachten we inzicht te hebben over in hoeverre geslachtshormonen bepalend zijn in het aansturen van de rol van TLR4 in pijnervaringen. Dit zou de basis kunnen zijn voor nieuwe potentiële therapieën voor pijnbestrijding, toegespitst op verschillen tussen mannen en vrouwen.</p> <p>Ook kan het inzichtelijk maken waarom de klinische manifestatie van arthritis anders is tussen mannen en vrouwen.</p> <p>Wij verwachten meer grip te krijgen op het pijnmechanisme en hoe het kan dat mannen en vrouwen verschillen in hun pijnervaringen. Ons project zorgt er echter ook voor dat we meer kennis krijgen over de soorten en duur van pijn in reumatische diermodellen in zijn algemeenheid en wat de impact is van het gebruik van beide geslachten tijdens dierproeven. Op basis van deze informatie zal er in de toekomst een betere afweging gemaakt kunnen worden over het gebruik van pijnstilling tijdens diermodellen.</p>

3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>Het maximaal berekende aantal dieren is 7718.</p> <p>Bij deze berekening is echter geen rekening gehouden met de go-no-go momenten op basis waarvan we zullen beslissen om niet alle proeven uit te voeren. Allereerst zullen we beslissen welke diersmodellen het meest relevant zijn voor het beantwoorden van onze vraag. Na de eerste proeven zullen we daarmee een selectie maken welke modellen er verder gebruikt worden. Hierdoor zal een deel van de overige omschreven proeven vervallen. We verwachten met ongeveer de helft van de modellen verder te gaan. Daarnaast zal op basis van het eerste deel ook helder worden welke pijnmetingen nuttig zijn om uit te voeren en welke minder informatie opleveren. Pijnmetingen die geen informatie, of te weinig informatie, opleveren, zullen niet langer uitgevoerd worden, hetgeen het aantal dieren dat nodig is voor een proef zal verminderen. In werkelijkheid zal dit aantal daarom significant lager liggen.</p>
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<p>De muizen in onze proeven zullen reuma of artrose krijgen. Hierdoor zullen ze minder mobiel worden en pijn ervaren. Daarnaast zal een deel van de muizen een operatie ondergaan om artrose te veroorzaken of om ze te steriliseren. Dit laatste is noodzakelijk om de bijdrage van hormonen te onderzoeken. Een operatie zal ook voor ongerief zorgen bij de dieren.</p> <p>Verder zullen de muizen voor de pijnmetingen regelmatig opgepakt en gefixeerd (vastgehouden) worden of tijdelijk in een kleine ruimte gezet worden hetgeen stress kan veroorzaken. Daarnaast zullen we voor sommige pijnmetingen de pijngrens van de muis onderzoeken, hetgeen betekent dat we ze zullen belasten met een prikkel die niet als pijnlijk wordt ervaren tot het moment dat de muis middels gedrag aangeeft het niet langer pijnloos te ervaren. Dit is dus het laagste punt/de minimale waarde waarop de muis iets als pijnlijk of vervelend begint te ervaren.</p> <p>Aangezien een aantal proeven uitgevoerd zullen worden in oudere dieren kunnen deze dieren last krijgen van ouderdomsverschijnselen.</p>
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	<p>De muizen die reuma of artrose krijgen ondervinden hiervan een ongerief dat wordt ingedeeld in de classificatie matig. Ook voor operatie geldt de classificatie matig. Het uitvoeren van de verschillende pijnmetingen wordt ingeschat als mild. Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als 100% matig omdat alle dieren herhaaldelijk een pijnmeting ondergaan.</p>
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	<p>Na afloop van de proef worden de dieren gedood waarna er weefsel wordt verwijderd voor verdere analyse.</p>

## 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.

In dit project onderzoeken we pijnverschillen tussen geslachten in reumatische ziekten en de invloed van hormonen en het immuunsysteem daarop. Daar hebben we een model voor nodig waarin we minstens de volgende factoren moeten kunnen nabootsen: het ziekteproces zelf, waarvoor een immuunsysteem nodig is; pijn, waarvoor een centraal zenuwstelsel (hersenen en ruggemerg) en een perifere zenuwstelsel (alle zenuwen buiten het centraal zenuwstelsel) nodig is; hormonen en geslacht. Al deze factoren zijn onmogelijk om samen na te bootsen buiten het lichaam. Op dit moment is het nog niet mogelijk om de factor geslacht na te bootsen buiten het lichaam omdat we daarvoor het hele complexe hormonale systeem missen. Daarnaast kunnen we het immuunsysteem, alle onderdelen van een gewricht en de interactie daartussen, nog niet nabootsen buiten het lichaam. Pijn nabootsen is al helemaal onmogelijk aangezien daar hersenen voor nodig zijn. De details van deze studie die we wel buiten het lichaam in een kweekstelsel na kunnen bootsen, zullen we daadwerkelijk uitvoeren zonder dieren. Zo zullen we bijvoorbeeld in een kweekstelsel met cellen afkomstig van mensen en materiaal uit eerdere dierexperimenten onderzoeken hoe geslachtshormonen in staat zijn de functie van TLR4 te veranderen. Dit doen we door cellen bloot te stellen aan stoffen die normaliter TLR4 activeren. Vervolgens onderzoeken we of de aanwezigheid van geslachtshormonen de functie van TLR4 dan daadwerkelijk verandert door de reactie van de cellen te bestuderen. Bovendien investeren we tijdens dit project in het nabootsen van een zenuwstelsel in een kweekstelsel buiten het lichaam in de hoop in de toekomst nog meer proeven zonder dieren te kunnen uitvoeren. Zo proberen we met cellen die zenuwuiteinden kunnen vormen te onderzoeken wat de functie van TLR4 hierin is en of we deze met geslachtshormonen kunnen beïnvloeden. Op dit moment kunnen we echter nog niet vaststellen of de reactiepatronen die we in een kweekomgeving met cellen zien ook echt signalen nabootsen die leiden tot een pijnervaring in mensen en dieren. Daarom kunnen we nog niet bepalen of we de gevonden effecten uit een vereenvoudigd experiment buiten het lichaam een afspiegeling van pijn kunnen noemen. Mede door het combineren van informatie die we krijgen uit de proeven in dit project, in combinatie met de vereenvoudigde kweek proeven, hopen we uiteindelijk wel een stap dichterbij te kunnen komen om proefdiervrij pijnonderzoek op te zetten. Zo zullen we aan het einde van de proef de dorsale hoornen van de dieren isoleren. Dit zijn bolletjes die de cellichamen van de zenuwen bevatten en dicht tegen het ruggemerg aan liggen. Hierin zullen we onderzoeken of de reactiepatronen van de cellen in de dorsale hoorn overeenkomen met de daadwerkelijke pijn die we meten middels de pijnmetingen in de dierproeven. Zo weten we welke reactiepatronen we in onze vereenvoudigde kweek proeven moeten nastreven om pijnreacties zo goed mogelijk na te bootsen.

4.2	<p><b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>	<p>In dit project hebben we een maximum aantal muizen berekend, maar het doel is om zo min mogelijk dieren te gebruiken. Nadat we hebben vastgesteld dat er verschillen zijn tussen mannen en vrouwen en of deze onderhevig zijn aan geslachtshormonen en TLR4 functie, zullen we een selectie maken van de voorgestelde proeven. Op basis van de actuele informatie die we in het eerste deel vergaard hebben, kunnen we vaststellen welke proeven echt nodig zijn om de hypothesen te toetsen en vragen te beantwoorden. We zullen daarmee dus niet alle beschreven proeven daadwerkelijk uitvoeren. Daarnaast zullen we in het eerste deel verschillende pijnmetingen uitvoeren. Op basis van deze metingen, kunnen we vaststellen welke pijnmetingen het meest relevant zijn en ons voor verdere proeven beperken tot deze relevante metingen.</p> <p>Voor de pijnmetingen hebben we ervoor gekozen om een tweetal metingen te combineren binnen 1 muis. Daardoor hebben we niet voor elke meting een aparte muis nodig. We hebben daarvoor gekozen om een meting te doen waarbij de muis minimaal ongerief ondervindt doordat er geen actieve prikkel wordt toegediend en deze te combineren met een meting waarbij wel een prikkel wordt toegediend.</p> <p>Door eerst een passieve meting te doen, beïnvloedt dit de tweede meting niet en kunnen beide metingen in 1 muis plaatsvinden. Een voorbeeld hiervan is een eerste meting waarbij de muis bijvoorbeeld alleen hoeft te lopen of te zitten hetgeen geen of minimaal ongerief veroorzaakt, en vervolgens een tweede meting waarbij de muis wel ongerief ondervindt, zoals een drukmeting op het gewricht of prikken met een dun kunststof filament (“haartje”) onder de voet hetgeen als irritant of beginnend pijnlijk zal worden ervaren.</p> <p>Dit reduceert het aantal benodigde muizen met 50%. Het combineren van meer metingen is helaas niet mogelijk omdat een verdere toename in het aantal handelingen met de muis de pijnmetingen onbetrouwbarder maakt.</p>
4.3	<p><b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p>	<p>In dit project wordt gebruik gemaakt van muizen die door een of meerdere injecties artrose of reuma ontwikkelen. We maken hierbij gebruik van verschillende ontwikkelde muismodellen voor beide ziektebeelden omdat de oorzaak van reuma en artrose niet bij elke patiënt hetzelfde is. De onderliggende processen die leiden tot het ontstaan van de ziekte kunnen verschillen per persoon. Daarom gebruiken we in dit project ook verschillende modellen die elk een ander onderliggend proces hebben dat uiteindelijk leidt tot artrose dan wel reuma. Voor artrose gebruiken we een model dat door ontsteking veroorzaakt wordt en een model dat door schade wordt veroorzaakt (denk hierbij aan het ontstaan van artrose als gevolg van een blessure). Voor reuma gebruiken we bovendien een drietal modellen, waarbij het ontstaan van reuma bij het ene model afhankelijk is van de TLR4 receptor, een ander model waarbij het ontstaan van de ziekte juist helemaal geen TLR4 betrokkenheid heeft, en een derde model met een ziektefase die wel via TLR4 en een fase die niet via TLR4 loopt. In deze modellen kunnen we onderzoeken of de betrokkenheid van TLR4 in pijn afhangt van de betrokkenheid van TLR4 in het ziekteproces zelf. Op deze wijze krijgen we inzicht of onze bevindingen universeel zijn voor mensen met reuma en/of artrose of dat het alleen geldt voor een specifieke selectie van patiënten met een specifieke onderliggend proces dat leidt tot ziekte.</p> <p>Alle injecties en operatieve handelingen worden uitgevoerd onder anesthesie/narcose. Na operatie worden de muizen op warme matten geplaatst om de lichaamstemperatuur op peil te houden. Helaas is het niet mogelijk om pijnstilling toe te passen omdat we in dit project juist pijnverschijnselen en/of gedrag moeten kunnen kwantificeren. Een ander probleem is dat pijnstillers het ontstaan van het model kunnen beïnvloeden, waardoor het onmogelijk wordt om reuma of artrose te bestuderen. Rondom operaties wordt er wel kortdurend pijnstilling toegepast.</p> <p>Onze metingen zullen informatie opleveren over het verloop van pijn gedurende deze experimentele modellen, hetgeen door anderen weer gebruikt kan worden voor correcte toediening van eventuele pijnstilling. Verder geeft het inzicht in welke pijnmetingen in de toekomst wel en niet nuttig zijn voor de verschillende experimentele modellen doordat we verschillende pijnmetingen uitvoeren in hetzelfde model. Zo kunnen we middels publicatie aangeven welke metingen niet langer relevant zijn voor deze diersoorten.</p> <p>We zullen de muizen in verrijkte kooien met voldoende schuilmogelijkheden plaatsen. De muizen worden in groepen gehuisvest. Alle metingen binnen 1 proef zullen door dezelfde groep onderzoekers gedaan worden om het gedrag van de muizen niet wisselend te beïnvloeden.</p>

4.4

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

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zal de proef voor een dier direct beëindigd worden wanneer een dier ongerief ervaart dat ernstiger uitvalt dan het ongerief dat redelijkerwijs op basis van de proef zelf verwacht kan worden. Dit noemen we de humane eindpunten. Muizen zullen daarom regelmatig gewogen worden en dagelijks geïnspecteerd op grove gedragsveranderingen en algemeen welzijn om onnodig ongerief te voorkomen. Zo zal een gewichtsverlies van meer dan 20% 1-3 dagen na een ingreep gezien worden als een humaan eindpunt. Het is te verwachten dat de dieren ongerief ervaren van de reuma dan wel artrose in hun aangedane gewricht. Wanneer de muizen echter hierdoor dusdanig beperkt worden in hun beweging dat ze niet bij hun voedsel of drinken kunnen, zelfs wanneer dat op de bodem van de kooi geplaatst wordt, wordt dit ook als een humaan eindpunt gezien. In het onverwachte scenario dat er zelf mutulatie op treedt om wat voor reden dan ook (knagen aan eigen voeten of tenen) zal dit ook leiden tot beëindigen van de proef voor het desbetreffende dier. Specifiek voor het reumamodel CIA zal ook ontsteking in de aangedane gewrichten gemeten worden en gescoord met het blote oog op een schaal van 0-8. Een score hoger dan 7 zien wij ook als een humaan eindpunt.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

31-01-2020

Beoordeling achteraf

Nee