

BIOTECHNIEK

tijdschrift voor proefdierkunde

Uit de gouden doos Diermodellen van reumatoïde artritis

Biotechniek wordt al 60 jaar uitgegeven. De redactie wil het huidige proefdierkundig veld graag laten meegenieten van wat haar voorgangers in de eerste Biotechnieken hebben gepubliceerd. In de rubriek: Uit de gouden doos publiceren we paretjes van toen, die vaak nog verrassend actueel zijn.

Introductie Nelleke Verhave

In Biotechniek zien we vanaf 1996 de term 3V verschijnen. Niet omdat daarvoor vervanging, verfijning en vermindering niet plaatsvond, maar omdat de termen in dat jaar in de Wet op de dierproeven verschenen. Toch zijn de 3V's al eerder aanwezig in Biotechniek. Bijvoorbeeld in een mooi overzichtsartikel van Kort en Verheul (1991) over reumatoïde artritis. In 1991 schrijven de auteurs dat alternatieven in ontwikkeling zijn met gebruik van kraakbeen of synoviaal-cellen in weefselkweek. In hun aanbevelingen dat pijnbestrijding niet toepasbaar is, maar dat verfijning moet worden gezocht in de keuze voor het diermodel, een zo kort mogelijk experiment en het toepassen van een scoringssysteem. Ook lezen we dat samenwerking in een werkgroep zou helpen bij het bundelen van kennis en het optimaliseren van resultaten.

In 2015 schrijft een Europese werkgroep een artikel over verfijningen in artritismodellen. In dit artikel lezen we dat in sommige gevallen de acute pijn kan worden behandeld [1] en dat een scoringssysteem tot in detail is uitgewerkt. Maar ook hier wordt de keuze van het juiste diermodel net als in 1991 benoemd als belangrijke verfijning. In 2018 worden ook genetische diermodellen voor artritis beschreven [2]. En in 2020 lezen we dat op mensencellen gebaseerde cel- en weefselsystemen dé oplossing moet gaan zijn voor het vervangen en verminderen van proefdieronderzoek [3]. Daarin is de wens mogelijk gespecificeerd, maar na 20 jaar nog steeds dezelfde. Slechts een greep uit de literatuur, maar hier weer een gouden Biotechniek-artikel dat verrassend actueel is in het kader van de 3V's.

1. Hawkins P, Armstrong R et al (2015) Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research. *Inflammopharmacology* 23(4): 131–150.
2. Choudhary N, Lokesh K, et al (2018) Experimental animal models for rheumatoid arthritis, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 40:3, 193-200
3. Damerau A and Gaber T (2020) Modeling Rheumatoid Arthritis In Vitro: From Experimental Feasibility to Physiological Proximity. *International Journal of Molecular Science* 21(21): 7916.

Uit *Biotechniek* jaargang 30 (6), 1991 (artikel in originele spelling. Red).

Diermodellen van reumatoïde artritis

W.J. Kort¹, H.A.M. Verheul²

¹ Laboratorium voor Chirurgie, Erasmus Universiteit, Rotterdam

² Organon International B.V., Oss

Trefwoorden: reuma, diermodellen

Samenvatting

Het onderzoek waar hier melding van wordt gedaan is het resultaat van een opleidingsstage van Dr. W.J. Kort tot proefdierdeskundige; Dr. H.A.M. Verheul was zijn stagebegeleider. Het is tot stand gekomen door gesprekken met onderzoekers werkzaam in het reuma-onderzoek verbonden aan de universiteiten van Utrecht en Nijmegen; van Organon International B.V., Oss en ITRI TNO, Rijswijk. Het geeft een overzicht van de meest gebruikte typen onderzoek van reuma en de daarvoor gehanteerde diermodellen. Verder gaat het in op de mogelijkheden om het ongerief van de dieren in het reuma-onderzoek te verminderen.

Inleiding

In Nederland en België lijden 3% van de mensen aan reumatoïde artritis (reuma). Reuma kan soms op jeugdige leeftijd acuut ontstaan, maar meestal is het een chronisch verloopende ziekte, die zich geleidelijk van het ene naar het andere gewricht uitbreidt. De gewrichten worden dik, warm en pijnlijk, de klassieke kenmerken van een ontsteking. In de meeste gevallen worden de gewrichten van de handen en de voeten aangedaan. Soms doen andere gewrichten, zoals schouder en wervelkolom, ook mee in het ziekteproces. Ernstige vormen van reuma leiden tot blijvende invaliditeit, echter de ziekte is zelden dodelijk. Reuma komt overal ter wereld voor, neemt toe met de leeftijd, en komt 2x zo vaak voor bij vrouwen dan bij mannen. Ook lijken erfelijke factoren een rol te spelen: binnen bepaalde families komt de ziekte duidelijk meer voor dan bij andere. De feitelijke oorzaak van de ziekte is nog onbekend. Zeker is, dat het afweersysteem een belangrijke rol speelt.

Verder wordt gedacht aan kruisreacties met bacteriële infecties en hormonale invloeden.

Ter illustratie van dit laatste: Bij zwangere vrouwen met reuma verdwijnen vaak de klachten, terwijl na de geboorte van het kind, de ontsteking weer opvlamt. In hoeverre deze beschermende rol van geslachtshormonen een directe of een indirecte (b.v. via het immuunsysteem) is, is nog niet bekend. Bij de behandeling van reumapatiënten richt men zich noodgedwongen op het remmen van de ontsteking, aangezien de oorzaak van de ontsteking nog onbekend is. Dit gebeurt meestal met corticosteroiden of aspirine-achtige stoffen. Andere medicijnen tegen reuma zijn de goud-verbindingen, die al vanaf de middeleeuwen zijn gegeven bij bepaalde infectieziekten. De preciese werking is onbekend, maar een deel van de patiënten vindt er wel degelijk baat bij. Verdere mogelijkheden om het ontstekingsproces aan te pakken zijn voorlopig nog slechts in de onderzoeksfase.

Onderzoek naar betere geneesmiddelen voor reumapatiënten krijgen nog steeds veel aandacht. In Nederland wordt, zowel door de farmaceutische industrie als door vrijwel alle universiteiten onderzoek gedaan aan reuma. Hiervoor worden zo'n 20.000 dieren per jaar gebruikt. Het onderzoek is tweeledig: één deel richt zich op het ontstaan (oorzaak) van de ziekte en hoe dit te voorkomen (Tabel 1). Een ander deel betreft onderzoek naar mogelijke behandelingsvormen. Ten behoeve van beide typen onderzoek worden dierexperimenten uitgevoerd.

De modellen

Dierexperimenteel werk aan reuma kan worden gedaan door bepaalde deelprocessen van het ziektebeeld te bestuderen, b.v. door in een proefdier een gewrichtsontsteking te induceren, of door langs immunologische weg een ziektebeeld op te wekken dat zoveel mogelijk het totaalbeeld van reuma bij de mens benadert. Een probleem bij deze laatste optie is dat de feitelijke oorzaak van reuma nog niet bekend is. Deze laatste diermodellen geven dan ook slechts een benadering van de manier waarop

feitelijk reuma ontstaat. Ook bestaat er helaas geen goed "spontaan" reuma model in een proefdier. Een "spontaan" model, dat een aantal overeenkomsten vertoont met reuma is de MRL/1 muis. Deze muizestam ontwikkelt een systemische autoimmuunziekte, waarbij op den duur een gegeneraliseerd ontstekingsbeeld ontstaat met vergrote lymfeknopen, ontstekingsinfiltratie in de gewrichten en glomerulonephritis. Deze muizesoort wordt veel als model gebruikt voor SLE-onderzoek (systemische lupus erythematosus, een auto-immuunziekte), soms ook voor reuma-onderzoek. De ziektebeelden in de gehanteerde modellen vertonen qua symptomatiek en histopathologisch beeld een sterke overeenkomst met chronische gewrichtsontsteking bij de mens. Echter de oorzaak van reuma in proefdieren is mogelijk niet dezelfde als die van reuma bij de mens. Ook vindt in diermodellen slechts een korte periode van blootstelling aan een reuma-inducerende factor plaats, terwijl bij de mens de oorzakelijke factor mogelijk gedurende zeer lange tijd aanwezig is, of is geweest. De keuze voor een bepaald model voor reuma-onderzoek wordt in de eerste plaats bepaald door het type onderzoek, maar ook zaken zoals "traditie" (ooit eens mee begonnen, altijd goed gegaan, niet meer veranderen!) spelen een rol. Verder heeft ieder model zo zijn specifieke voor- en nadelen (b.v. hormoongevoelig, T-cel of complement afhankelijk, etc.). Vaak worden er dan ook verschillende modellen binnen één studie gebruikt om de conclusie van een bepaalde theorie of therapie te versterken. Ook maken sommige onderzoekers, geïnteresseerd in de etiologie van reuma, gebruik van het gegeven, dat niet iedere ratte- of muizestam even gevoelig is voor het krijgen van artritis. Onderzoek naar de oorzaken van deze verschillen in gevoeligheid, geeft dan mogelijk enig inzicht in de achtergronden van het ontstaan van reuma bij de mens.

onderzoeks groep	reuma model	proefdier	dieren/ jaar	type onderzoek
Org	A/B	rat	1.000	ther
KUN	B/C	rat	2.500	etio
KUN	D	muis	10.000	ther
RUU	A	rat	1.000	ther
ITRI	A/C	rat	3.000	ther/etio
ITRI	C	aap	10-15	ther/etio

Legenda:
 Org = Organon, Oss
 KUN = Universiteit Nijmegen
 RUU = Universiteit Utrecht
 ITRI = ITRI TNO, Rijswijk
 A = Adjuvant geïnduceerde artritis (AdIA)
 B = Streptococce cel wand geïnduceerde artritis (SIA)
 C = Collageen geïnduceerde artritis (CIA)
 D = antigeen geïnduceerde artritis (AnIA)
 etio = etiologisch gerelateerd onderzoek
 ther = therapeutisch gerelateerd onderzoek

Tabel 1

Adjuvant-geïnduceerde artritis (AdIA)

Adjuvant-geïnduceerde artritis is een vorm van reuma, die van oudsher het meest als onderzoeksmodel gehanteerd wordt. De onderliggende mechanismen van AdIA en de relevantie van het model zijn nauwelijks bekend. Hier wordt momenteel onderzoek naar gedaan. Het opwekken van AdIA gebeurt d.m.v. een subcutane injectie van een emulsie van gedode bacteriën, (b.v. Mycobacterium tuberculosis), in olie in de staartwortel of in de voetzool van de achterpoot van de rat (N.B. injectie in de poot is altijd veel belastender!). Wanneer de injectie goed is uitgevoerd wordt het immuunsysteem geactiveerd en ontstaat er een ontsteking, eerst in een acute vorm, met lokale zwelling en soms ulceratie. Daarna systemisch, met de bekende symptomen van reuma: zwelling, roodheid, pijn, en weefselproliferatie van de gewrichten, voornamelijk die van de extremiteiten. De heftigheid van de ziekte wordt bepaald door de hoogte van de dosering van het adjuvant en van de gekozen rattestam. Geslachtsverschillen in de reactie bij AdIA lijken niet aanwezig.

Het protocol voor een AdIA-experiment ziet er als volgt uit:

- inductie van het agens s.c. in staart of poot: dag 0
- acute ontsteking staartwortel of poot: dag 1-5
- chronische ontsteking van de gewrichten: vanaf de tweede week.

- euthanasie na een maand.

Afhankelijk van de vraagstelling zal therapie worden gegeven tussen dag 0 en terminaal. Belasting van het dier is afhankelijk van de injectieplaats, de dosering van het adjuvant en van de gehanteerde parameters (meting voetzwelling, lichaamsgewicht).

Nadelen van AdIA:

er wordt in de literatuur aangegeven, dat er grote spreiding zou zijn in de ernst van de artritis, mogelijk als gevolg van gevoeligheid van het model voor veranderingen in de voedingsen immuunstatus van het dier.

Overigens zijn niet alle geïnterviewde onderzoekers het hier mee eens.

- soms treedt ernstig oedeem en ulceratie op de injectieplaats op, waardoor het dier ongeschikt wordt voor verdere observatie.
- soms is er sprake van langdurig ernstig ongerief voor het dier.
- op een aantal belangrijke punten komt AdIA niet overeen met reuma bij de mens (b.v. geen sexe-gevoeligheid; geen sterke genetische binding; geen periodes van remissie), ziekte is niet chronisch, ziekte is alleen te induceren in speciale rattendammen.

Streptococce celwand-geïnduceerde artritis (SIA)

Deze vorm van artritis verschilt qua procedure en qua uiterlijke kenmerken niet veel van het voorgaande model. Echter de heftigheid van het ziektebeeld is minder uitgesproken. Ook de spreiding binnen de groep van responders zou minder zijn. Verder is het model wel gevoelig voor sexfactoren en daarmee beter te vergelijken met het klinisch beeld van reuma bij de mens.

Bij SIA zijn "gesonificeerde" (d.w.z. met behulp van ultrasone trillingen kapot gemaakte) celwanden van streptococce de artritis inducerende factor. Bepaalde onderzoekers lossen deze celwanden op in een waterig medium, terwijl anderen ze mengen in incomplete Freund's adjuvant. Het geheel wordt i.p. ingespoten bij het dier, waarna zich binnen een aantal dagen een acute ontsteking ontwikkelt in de gewrichten van de extremiteiten, na 10-15 dagen gevolgd door een chronische gewrichtsontsteking. Deze ontsteking kan tot 120 dagen aanhouden en kent soms periodes van remissie.

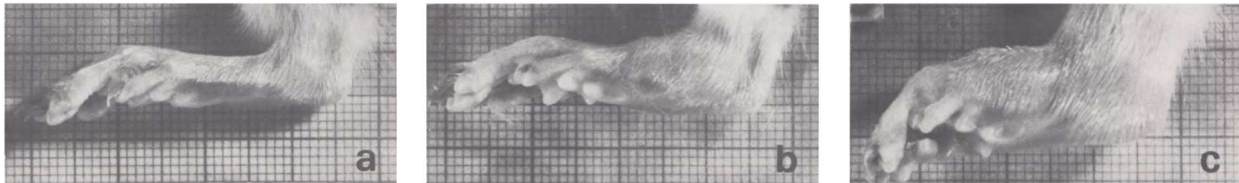
Het protocol voor een SIA-experiment ziet er als volgt uit:

- injectie van de celwanden i.p.: dag 0
- acute gewrichtsontsteking van de extremiteiten: dag 1-3
- chronische gewrichtsontsteking: vanaf dag 10 euthanasie: meestal binnen enkele maanden.

Experimenten waarin middelen worden getest om reuma te behandelen worden meestal toegediend vanaf dag 3, zodat vaak slechts bij de controle niet-behandelde dieren de gewrichtsontsteking manifest wordt. Het ongerief van het dier kan worden beperkt wanneer met een goed uitgeteste bacterie van het reuma-agens wordt gewerkt.

Nadelen van SIA:

- in sommige gevallen is SIA ernstig belastend voor het dier (b.v. bij uittesten van een nieuwe batch van reuma-agens).
- het is niet bekend in hoeverre streptococce of andere bacteriën een rol spelen bij de ontwikkeling van reuma bij de mens.
- ziekte alleen te induceren in bepaalde rattendammen.
- grote variatie van verschillende streptococce celwand fracties.



Afbeelding 1: Panel a laat een achterpoot van een controle rat zien. Panel b en c achterpoten van ratten met matige respectievelijk ernstige arthritis ca 50 dagen na intraperitoneale behandeling met celwandfragmenten.

Type II Collageen-geïnduceerde arthritis (CIA)

Voor CIA gebruikt men lichaamseigen type II collageen, dat in een emulsie van incompleet Freund's adjuvant is gebracht. Ook van dit model wordt beweerde, dat het serologisch, histologisch en radiologisch sterk met menselijk reuma overeenkomt. Met name omdat sera van sommige patiënten met reuma grote hoeveelheden anti-collageen IgG bevatten.

Het protocol voor een CIA-experiment ziet er als volgt uit:

- injectie van de emulsie intradermaal in de staartwortel: dag 0
- booster injectie subcutaan: dag 7
- acute gewrichtsontsteking van de extremiteiten: dag 1-3
- chronische gewrichtsontsteking: vanaf tweede tot vijfde week
- euthanasie: meestal binnen enkele maanden.

Experimenten waarin middelen worden getest om reuma te behandelen worden veelal toegediend vanaf dag 3 zoals bij de voorgaande protocollen, echter er zijn ook protocollen bekend waarbij therapie al vooraf wordt gegeven. Door de grote spreiding in de hevigheid van de ontsteking kan "ernstig ongerief" in dit model voorkomen, naast dieren waarin de ziekte nauwelijks aanwezig lijkt te zijn.

Nadelen van CIA:

stechts in 40-60% van de dieren wordt CIA geïnduceerd, kan worden geïnduceerd in ratten en muizen, echter grote stamverschillen in sommige gevallen ernstig belastend voor het dier. het is niet bekend in hoeverre het ontstaan van antilichamen tegen het eigen collageen een rol speelt bij de ontwikkeling van reuma bij de mens.

Antigeen-geïnduceerde arthritis (AnIA)

De procedure voor antigeen geïnduceerde arthritis verschilt van de voorgaande methodes in die zin, dat AnIA lokaal wordt opgewekt, terwijl de voorgaand besproken methodes van reuma in principe systemisch werden opgewekt (soms wordt SIA ook wel eens lokaal gegeven). Het dier wordt gesensibiliseerd door gelijktijdig toediening van een aantal subcutane injecties runder-serum-albumine (BSA) terwijl soms additioneel intraperitoneaal een injectie van gedode bacteriën (b.v. Bordetella pertussis) wordt gegeven. Na een week krijgen de dieren een booster injectie van BSA, waarna 3 weken later BSA in één van de gewrichten wordt geïnjecteerd. In dit gewricht ontstaat een chronische arthritis. Men kan de arthritis doen "opvlammen" ("flare reaction") door een intraveneuze injectie van BSA in de chronische fase van de ziekte te geven.

Het protocol voor een AnIA-experiment ziet er als volgt uit:

- s.c. injecties van BSA: dag 0
- i.p. injectie van Bordetella pertussis in incomplete Freund's adjuvant: dag 0
- s.c. booster injectie met BSA: dag 7
- injectie van BSA in het gewricht: dag 21
- chronische ontsteking: vanaf de vijfde week
- euthanasie: meestal binnen 2 maanden.

Experimenten waarin middelen worden getest om reuma te behandelen worden meestal toegediend tegelijkertijd met de "challenge", d.w.z. na 3 weken, met de injectie van BSA in het gewricht.

Dit protocol beperkt het ongerief van de gewrichtsontsteking tot het ingespoten pootje.

Nadelen van AnIA:

- in sommige gevallen ernstig belastend voor het dier
- relevantie met reuma onbekend (zie eerdere opmerkingen in dit verband bij de vorige modellen).

Alternatieven

Alternatieven voor de beschreven modellen lijken vooralsnog niet aanwezig te zijn, dus voorlopig zal het reuma onderzoek zich met één of meer van deze modellen moeten behelpen. Het uitspreken van een voorkeur voor een bepaald model is moeilijk. Vooral omdat de hoeveelheid ongerief voor het dier niet zozeer bepaald wordt door de keus van een model, maar meer door de dosis van de toegediende reuma-verwekkende stoffen. Bovendien heeft de onderzoeker over het algemeen duidelijke redenen waarom hij/zij voor een bepaalde model kiest en zal dus niet zonder meer bereid zijn over te stappen naar een "vriendelijker ogend" model. Een beetje apart staat het model van de MRL/1 muis, die spontaan een systemische auto-immuunziekte ontwikkelt, met soms enige artritis verschijnselen. Hoewel de resultaten in dit model wat betreft het reuma onderzoek voorlopig nog teleurstellend zijn, lijkt het ons dat de mogelijkheden van dit muizemodel, met name voor het onderzoek naar de therapeutische werkzaamheid van nieuwe anti-reuma middelen, nog niet volledig zijn benut. Ook het vooraf screenen van nieuwe farmaca met potentiële anti-reuma eigenschappen op kraakbeen of synoviaal cellen in weefselkweek systemen zal mogelijk vermindering van het aantal dieren voor reuma-onderzoek opleveren. Op het ogenblik worden deze methoden echter vrijwel uitsluitend gebruikt voor het meten van de aangedane schade in ontstoken gewrichten.

Resultaten en discussie

Geen van de momenteel gebruikte therapieën van reuma zijn "ideaal". Hierdoor is reuma-onderzoek nog steeds gerechtvaardigd, hoewel met de huidige "klassieke" therapieën 70 tot 80% van de reuma-patiënten hun dagelijkse werkzaamheden na behandeling kan voortzetten. Bovendien kan het onderzoek in reuma modellen niet alleen iets waardevols voor reuma opleveren, maar kan het ook zijn spin-off hebben voor andere autoimmuun-achtige ziekteprocessen.

In de door ons geïnterviewde researchgroepen in Nederland worden een 5-tal modellen van RA gehanteerd (Tabel 1). De score voor de mate van ongerief is bij al de modellen meer dan 3 op de schaal, die gehanteerd wordt voor de wettelijke registratie van de proefdieren. Dit komt overeen met "ernstig ongerief, langer dan 24 uur". De Wet op de Dierproeven is echter niet duidelijk wanneer het gaat over "gering of matig" ongerief, dat langer dan 1 dag aanhoudt. Hoe score je b.v. matig ongerief, dat gedurende meer dan 30 dagen aanhoudt? Ook zijn de verschillen in ongerief voor verschillende dieren binnen één experiment soms erg groot, terwijl het hele experiment in de scoring van het ongerief over een kam wordt geschoren. Dat betekent dat de onderzoeker geen "beloning" krijgt voor de door hem of haar aangebrachte verfijningen, hetgeen demotiverend kan werken.

Wanneer we zo ruim mogelijk proberen verfijningen aan te brengen in het reuma onderzoek, met als oogmerk het welzijn van de dieren te optimaliseren, komen de volgende mogelijkheden in aanmerking:

- 1) pijnstillers tijdens het experiment.
- 2) tranquillizers tijdens het experiment.
- 3) gebruik van minder belastende reuma- modellen.
- 4) verkorting tijdsduur van het experiment.
- 5) verbetering/verfijning van de experimentele procedures.
- 6) verbetering/verfijning van de huisvestingsomstandigheden.
- 7) dierverzorgers/biotechnici betrekken in overleg.
- 8) Nederlandse werkgroep "Arthritis Modellen".

1) Pijnstillers

Hier doen zich een groot aantal problemen voor. In de eerste plaats is het moeilijk om bij dieren pijn vast te stellen. Een aantal onderzoekers meenden dan ook dat hun dieren zeker "last", d.w.z. ongerief hadden van de geïnduceerde artritis, maar van pijn waren ze niet overtuigd. Dat betekent ook dat wanneer met pijnstillers werd gewerkt, een objectieve verbetering moeilijk of niet bleek vast te stellen. Een ander probleem is dat een belangrijke groep pijnstillers van het type is (aspirine-achtigen), dat sterk interfereert met het ziektebeeld van reuma zelf. Hiermee wordt dan onmiddellijk de mogelijkheid afgesneden dit soort stoffen te gebruiken. Het is echter niet uitgesloten, dat andere pijnstillers, zoals opiaten of het stimuleren van de eigen endorphine secretie van het dier, mogelijk als pijnstillende therapie gebruikt zouden kunnen worden. Het tot nu toe hieraan uitgevoerde onderzoek (met methadon als pijnstiller, P. Houben, D.W. van Bekkum, ITRI TNO, Rijswijk, gefinancierd door het Platform), had teleurstellende resultaten. Hernieuwde researchinspanningen wellicht met andere (meer langdurig werkende farmaca) lijken echter gerechtvaardigd. Het is overigens begrijpelijk, dat een onderzoeker in het algemeen geneigd is te veronderstellen dat iedere pijnstiller zijn experiment nadelig zou kunnen beïnvloeden. Bovendien is de winst van pijnbestrijding "slechts" voor het proefdier en het "risico" (van een slecht experiment) voor de onderzoeker. De onderzoeker zal er echter wel rekening mee dienen te houden dat stress ook zijn experimenten o.a. via een prikkeling van de bijnierschors hormonen zal kunnen beïnvloeden.

2) Tranquillizers

Wat voor de pijnstillers geldt, geldt ook voor de tranquillizers, waar ook de angst voor interferentie met reuma in principe aanwezig is. Bovendien bleek in een klinisch onderzoek, dat therapie met hydroxyzine, prochlorperazine en chlordiazepoxide, allen tranquillizers, chronische pijn niet objectief kon worden verminderd. Opgemerkt dient te worden, dat tranquillizers geen pijnstillers zijn, en dan ook niet in de Wet op de Dierproeven als een methode van pijnbestrijding kunnen worden opgenomen. Omdat er echter nog zo weinig aandacht is besteed aan het toedienen van tranquillizers aan ratten in reuma-modellen, lijkt het ons gerechtvaardigd, dat deze categorie stoffen meer aandacht verdient als een mogelijk middel om het ongerief voor het dier in het reuma-experiment te verminderen. Het zou immers mogelijk kunnen zijn dat tranquillizers de appreciatie (=waardering) van de pijn verminderen en in die zin het welzijnsgevoel van het dier verbeteren.

3) Keuze model

Zoals eerder is opgemerkt dient het model gebruikt te worden, dat het meest overeenkomt met die van het te onderzoeken ziekteproces bij de mens, zelfs als dit een model is, dat relatief meer leed voor het dier zou betekenen. Wanneer echter extrapolatie naar de klinische situatie bij meerdere modellen even volwaardig (of onvolwaardig) is zal het model gekozen moeten worden waarbij sprake is van het minste ongerief voor het dier. Voorlopig is deze laatste gedachtengang nog hypothetisch omdat ons inziens kiezen uit de beschreven modellen niet een "beste model" oplevert. Ook dieren

fokken, waarin de ziekte reuma spontaan voorkomt, zoals dus het geval is bij de MRL/1 muis, gaat vanzelfsprekend gepaard met fors ongerief, wanneer de dieren langdurig in leven worden gehouden. Het lijkt dus min of meer een tegenspraak: zodra reuma wordt opgewekt gaat het gepaard met ongerief en pijn, welk model dan ook.

4) Duur van het experiment

Iedere verkorting van de tijdsomvang van het experiment zal leiden tot een objectieve verbetering van het welzijn van het dier (hoewel de Wet op de Dierproeven hier slechts beperkt op inspeelt). Het lijkt haalbaar de meetgegevens van een onderzoek dagelijks te testen om te zien óf een bepaald beoogd statistisch verschil al is bereikt, of toch niet meer bereikt kan worden (d.w.z. testen met een z.g. "Sequentie analyse"). Het flexibel stellen van het eindpunt voorkomt dat dieren onnodig lang in een experiment zitten. Zeker wanneer gebruik gemaakt wordt van speciaal hiervoor geschreven computer programma's zal het extra werk van zo'n procedure gering zijn.

5) Verfijning/verbetering van de parameters

Er zijn een aantal nieuwe ontwikkelingen, die mogelijk kunnen leiden tot verbeterde meetcriteria voor de effectiviteit van te testen farmaca, waarbij de winst dan vooral zal zijn het aantal dieren, dat voor reuma onderzoek gebruikt zal worden. In dit kader kunnen we noemen de methode van Technetium isotoop scanning, waarbij het mogelijk is longitudinaal onderzoek van reuma te doen. Deze methode is zeker dierbesparend t.o.v. de tot dusverre gehanteerde methodes van sequential killing. Verder zijn er nieuwe parameters in ontwikkeling (serologisch onderzoek, inhibitietesten), die de tijd van het dier in het experiment wellicht verkorten doordat eerder dan voorheen verschillen in therapie aantoonbaar zijn.

6) Verfijning/verbetering huisvesting

Wanneer de dieren een forse gewrichtsontsteking ontwikkeld hebben reageren ze geprikkeld op andere ratten, die over hen heen lopen. Het maximale aantal dieren gehuisvest in één bak, onafhankelijk van gewicht, zou niet meer mogen zijn dan 3. Extra bedding van een niet te scherpe soort, lange drinkpippels en eventueel voer in de bak, veraangenamen verder de omstandigheden voor het dier. Verder zouden in één bak geen dieren bij elkaar moeten zitten, die een duidelijk van elkaar verschillende conditie hebben.

7) Dierverzorgers/biotechnici

Het spreekt vanzelf dat dierverzorgers en biotechnici een belangrijke stem moeten hebben in hoever je met een dier in experiment mag gaan. In alle bezochte onderzoeksgroepen werd het belang van het hebben van een goede overlegsituatie tussen de biotechnicus/dierverzorger en de onderzoeker onderschreven. Echter afspraken over terminatie en maximale toelaatbaarheid zouden vooraf, en meer gestructureerd, moeten worden vastgelegd in het werkprotocol.

8) Nederlandse werkgroep "Arthritis Modellen"

Uit de gesprekken met de onderzoekers bleek dat de onderlinge contacten van de eerder gemelde groepen redelijk waren. Er bestaat echter slechts op zeer beperkte schaal een samenwerkingsverband van RA-onderzoek en er is zeker geen sprake van een feitelijke werkgroep. RA-onderzoek is sterk belastend voor het proefdier en staat aan veel kritiek bloot. In bepaalde landen mag RA onderzoek slechts zeer restrictief uitgevoerd worden. Het is dan ook wenselijk dat ook in Nederland RA-onderzoeksgroepen samenwerken om zo veel mogelijk kennis te bundelen en gebruik te maken van gelijke proefopstellingen en meetmethodes ten einde de onderlinge vergelijkbaarheid van resultaten te optimaliseren. Wellicht zou de Veterinaire Hoofinspectie hiertoe initiatieven kunnen nemen.

Conclusies en aanbevelingen

Voorlopige concluderen wij dat pijnstillers en tranquillizers in reuma experimenten óf niet werken óf interfereren met het onderzoek. Toch lijkt ons dat zowel t.a.v. het gebruik van pijnstillers als van tranquillizers nieuw onderzoek gerechtvaardigd is. Een uitspraak over het "ideale model" valt niet te geven. Een aanbeveling voor een bepaalde keus tussen de gehanteerde modellen lijkt dan ook niet opportuun. Voorlopig zijn de mogelijkheden van in vitro-modellen voor het reumaonderzoek nog heel beperkt, maar voor het voorscreenen van nieuwe farmaca zouden ze in principe gebruikt kunnen worden. Winst lijkt direct haalbaar in het verkorten van de tijdsduur van de dieren in experiment. Het zou de moeite waard zijn een computerprogramma te schrijven waarmee de meetgegevens dagelijks verwerkt worden zodat op basis van een sequentie-analyse een zo vroeg mogelijk eindpunt van het experiment wordt vastgesteld. Om vermindering van het ongerief voor dieren in reuma-experimenten goed tot uiting te laten komen in de scoring voor de wettelijke registratie, zou de nu gehanteerde scoring gewijzigd dienen te worden.

Een mogelijkheid zou kunnen zijn het dagelijks ongerief te vermenigvuldigen met de tijdsduur. In het kader van vermindering en verfijning lijkt het aan te bevelen een werkgroep van RA-onderzoekers in te stellen, waarin al het Nederlandse reuma-onderzoek wordt gebundeld. Van overheidswege (Platform) of vanuit patiëntenorganisaties (Reuma Eonds) zou geld beschikbaar moeten worden gesteld om onderzoek te doen naar alternatieve modellen en meetmethoden bij het reuma-onderzoek. N.B. Alle onderzoekers gaven aan wel belangstelling te hebben voor onderzoek naar alternatieven, maar geen mogelijkheid (geld!) te hebben dit te doen. Wellicht kunnen de omstandigheden van de dieren in experiment veraangenaamd worden door de huisvesting van de dieren aan te passen aan hun ongerief. Een laatste aanbeveling is dat dierexperimentencommissies en proefdierdeskundigen ex-artikel 14 gegevens van sterk voor het dier belastend onderzoek zouden moeten uitwisselen. Dit om doublures te voorkomen en inzage te verkrijgen in eikaars beoordelingsstrategieën.

Geraadpleegde literatuur

1. Bakker NP; Erck MG van; Zürcher C et al.: Experimental immune mediated arthritis in Rhesus monkeys as a potential model for human rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, 1990; 10:21-29.
2. Bekkum DW van; Bohre EPM; Houben PFJ and Knaan-Shanzer S: Regression of adjuvant arthritis in rats following bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989; 86:10090-10094.
3. Berg WB van den; Putte LBA van de; Zwarts WA and Joosten LAB: Electrical charge of the antigen determines intra-articular antigen handling and chronicity of arthritis in mice. *J. Clin. Invest.*, 1984; 74:1850-1859.
4. Broek ME van den: T-cell mediated exacerbations of experimental arthritis: A possible mechanism for chronicity. *Proefschrift* 1988.
5. Eden W van; Thole JER; Zee R van der et al.: Cloning of the Mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature*, 1988; 331:171-173.
6. Eden W van; Hogervorst EJM; Hensen EJ et al.: A cartilage mimicking T cell epitope on a 65KD Mycobacterial heat-shock protein: Adjuvant arthritis as a model for human rheumatoid arthritis. *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 1989; 145:27-43. Eden W van: Mycobacteriën en de oorzaak van reumatoïde artritis. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1988; 132:99-101. *Handbooks of Animals Models for the Rheumatic Diseases. Vol I.* Greenwald RA and Diamond HS, Eds., Boca Raton, CRC Press, 1988.
7. Lent PLEM van en Berg WB van den: Reuma. *Natuur en Techniek*, januari 1989, pp. 14-25. *Immunochemical Techniques. Part I. Chemotaxis and Inflammation.* In: Sabato G di, Ed. *Methods of Enzymology. Vol 162.*, San Diego, Academic Press, 1988; 339-385.
8. O'Sullivan FW; Fassbender HG; Gay S and Koopman WJ: Etiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like disease in MLR/1 mice. *Arthritis and Rheumatism*, 1985; 28:529-536.
9. Pearson CM and Wood FD: Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of Mycobacterial adjuvant. *Amer. J. Pathol.*, 1963; 42:73-95.
10. Schalkwijk J; Berg WB van der; Putte LB van de et al.: Effects of experimental joint inflammation on bone marrow and periarticular bone. A study of two types of arthritis, using variable degrees of inflammation. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1985; 66:435-444.
11. Weller K and Hay JB: What? Why? Where? - The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Sandorama* 1988/IIIIV, 1988; 9-14. Yosselson-Superstine S; Lipman AG and Sanders SH: Adjunctive antianxiety agents in the management of chronic pain. *Isr. J. Med. Sci.*, 1985; 21:113-117.