

Pre- en postoperatieve pijnmedicatie in het chronisch neuropathisch pijnmodel bij de rat

W.A. van den Brink, F.M van de Pol, T.P.H. Rouwette, K.C.P. Vissers

Afdeling Anesthesiologie, Pijn en Palliatieve zorg, UMC St Radboud

Geachte lezer,

In het vorige nummer van Biotechniek (2011-6) is de verkeerde versie van onderstaand artikel geplaatst. Waarvoor onze excuses. Bij dezen de correcte versie.

Inleiding

Chronische neuropathische pijn is een groot maatschappelijk probleem dat steeds vaker voorkomt. Deze ontstaat door een afwijking aan het centrale of perifere zenuwstelsel. Deze afwijking kan op verschillende manieren ontstaan, bijvoorbeeld als gevolg van een operatie of chemokuur. Ook patiënten met lage rugklachten en diabeten kunnen er last van krijgen. Naar schatting lijden 1-3 miljoen Nederlanders aan een vorm van neuropathische pijn en jaarlijks komen hier 6-8000 nieuwe patiënten bij. Patiënten met chronische neuropathische pijn zijn vaak niet in staat om te werken en hebben last van depressies, angststoornissen en/of slaapproblemen. De huidige behandelmethode werken niet bij alle patiënten met neuropathische pijn of zorgen voor vervelende bijeffecten. Dit maakt onderzoek naar de precieze werking van het neuropathische pijnmechanisme en het ontwikkelen van gerichte medicatie noodzakelijk. Wereldwijd wordt er naar verschillende pijnsoorten onderzoek gedaan. In 1988 is een artikel gepubliceerd waarin een neuropathisch pijnmodel werd geïntroduceerd bij ratten (1). Hier wordt door middel van een operatie de nervus ischiadicus van de linker achterpoot geligeerd en ontstaat een constrictieve beschadiging van deze zenuw. Het model wordt daarom ook wel het chronic constriction injury (CCI)-model genoemd. Een CCI-operatie bij ratten leidt tot pijngedrag dat overeenkomt met het gedrag van patiënten met neuropathische pijn. Hierbij horen specifieke kenmerken als allodynie (pijn bij normaal niet pijnlijke stimuli) of hyperalgesie (verhoogde gevoeligheid voor pijnstimuli).

De onderzoeksgroep van de afdeling Anesthesiologie, Pijn en Palliatieve zorg van het UMC St Radboud is in 2005 onderzoek gestart naar de oorzaak en bestrijding van neuropathische pijn en maakt hierbij gebruik van het hierboven beschreven CCI-model.

Studie

Als onderdeel van een groot experiment naar de farmacologische validatie van het CCI-model hebben we specifiek gekeken naar het welzijn van de ratten, en naar de mogelijkheid van het gebruik van pre- en post-operatieve pijnstilling om het ongerief van de dieren tijdens en na de operatie te verminderen. In dit artikel beperken we ons tot het effect van de peri-operatieve pijnstilling en het welzijn van de ratten.

Materiaal en Methode

Dieren en huisvesting

Deze studie is uitgevoerd met mannelijke Sprague-Dawley (SD) ratten van Harlan Frankrijk (gewicht 220-250 gram bij de start van het experiment). De ratten zijn per twee gehuisvest in een verhoogde Macrolon bak type II met kooiverrijking (retreats) van Tecniplast en cold flakes bedding van SPPS. In de huisvestingsruimte van de mannelijke CCI-ratten worden geen vrouwtjes gehuisvest, omdat dit te veel onrust veroorzaakt, wat de ontwikkeling van de neuropathie kan tegenhouden.

Voer en water zijn ad libitum aanwezig. De ratten komen een week voor de start van het experiment binnen om te acclimatiseren. Vanaf binnenkomst worden zij meteen op sojavrij voer (SNIFF) gezet. In eerder gepubliceerde artikelen is bewezen dat voeren mét soja de ontwikkeling van neuropathie in ratten tegenhoudt (2,3). De dieren zijn gehuisvest in een kamer met een 12 uur licht- en donkercyclus, waarbij tijdens de lichtperiode zachtjes een radio aanstaat. De kooien worden een keer per week verschoond.

Groepsindeling

In totaal zijn er 120 ratten gebruikt, verdeeld over drie groepen:

Groep	Met pijnstilling	Zonder pijnstilling
CCI-operatie (94 ratten)	53 ratten	41 ratten
Sham-operatie (13 ratten)	6 ratten	7 ratten
Niet geopereerd (13 ratten)	-	13 ratten

Met behulp van het programma GPOWER (4), hebben we bepaald dat bij een significantieniveau (α) van 5% en het gebruik van de tweezijdige T-toets, een minimum van zes dieren per groep noodzakelijk is. Aangezien de bepalingen in deze studie deel uitmaken van een veel grotere studie naar de farmacologische validatie van medicatie, zijn de meeste groepen groter dan het minimum aantal van zes dieren.

De sham-geopereerde ratten hebben bijna dezelfde operatie gehad als de CCI-geopereerde ratten. De nervus ischiadicus is bij deze dieren wel blootgelegd, maar niet geligeerd. Deze groep dient als geopereerde controlegroep. Hierbij dient opgemerkt te worden dat we als controle niet het niet-geopereerde pootje van de CCI-ratten hebben gebruikt, aangezien een unilaterale operatie ook bilateraal effect zou kunnen hebben. Om uit te sluiten dat de operatie of de pijnstilling van invloed is op de metingen worden er ook niet-geopereerde dieren gemeten.

CCI-operatie

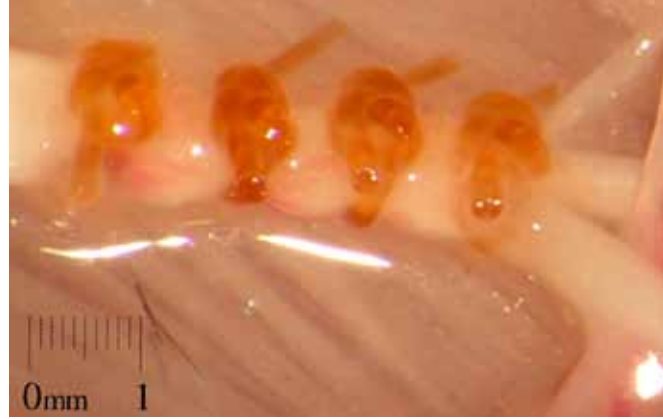
De operatieprocedure wordt uitgevoerd met behulp van een operatiemicroscoop (Leica –MC-1,



Afbeelding 1. Rat is onder anesthesie en ligt klaar voor de CCI-/Sham-operatie op de rechterzijde met de linkerpoot geschoren en gedesinfecteerd.

Heerburgg Swiss, max. vergrotingsbereik: 13,5). De ratten worden onder anesthesie gebracht door middel van isofluraan. Dit anestheticum wordt toegediend in combinatie met 2 liter N₂O en 650 ml zuurstof (FiO₂ 46 %). Ter bescherming van de ogen wordt occulentum oogzalf gebruikt. Omdat de ischiadicus van de linkerpoot wordt geligeerd, wordt de rat op de rechterzijde gepositioneerd (Afb. 1). Vervolgens wordt de linkerpoot geschoren en ontsmet met 70% alcohol en jodium. De rat wordt op zijn rechterzijde (kop naar links, staart naar rechts) op de operatietafel gelegd en de linkerpoot door middel van een rol gazen verhoogd. Hierna »

Afbeelding 2. Ischiadicus met vier chromic catgut 5/0 ligaturen.



wordt de huid geopend door verticaal een incisie van ongeveer 3 cm te maken, beginnend iets van de bovenkant van het dijbeen tot in het midden van de spier ter hoogte van het heupbot in het midden van de dij. De nervus ischiadicus wordt blootgelegd door met een scherpe schaar door de

biceps femoris te klieven. Met twee wondhaken wordt de biceps opgehouden zodat de nervus ischiadicus zichtbaar blijft. Proximaal van de trifurcatie wordt voorzichtig al het omliggende weefsel (vet en vliezen) losgemaakt van de nervus ischiadicus, zodat deze volkomen vrij komt te liggen. Met chromic catgut 5/0 worden vier ligaturen met een platte knoop om de nervus ischiadicus gelegd (Afb. 2). Belangrijk hierbij is dat de insnoering van de zenuw op de plek van de ligaturen in de gaten gehouden wordt. Zit een ligatuur te strak dan zal de rat automutilatie vertonen (zelf zijn poot beschadigen). Zit de ligatuur te los dan zal de rat geen neuropathie ontwikkelen. De strakte van de ligatuur kan in de gaten gehouden worden door de twitch van de spier onder de zenuw. Als de spier twicht, wordt de knoop niet verder aangetrokken. Het is ook van belang dat de bloeddoorstroming van de zenuw intact blijft. We hebben voor catgut gekozen vanwege het inflammatoire karakter (5). Na het aanbrengen van de ligaturen wordt de spier gesloten met een vicryl 5/0 doorlopende hechting en de huid wordt met losse agraves gesloten.

Pre- en post-operatieve pijnstilling

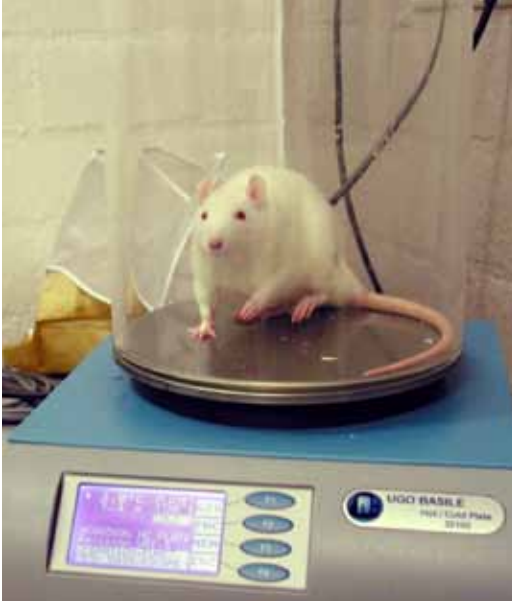
De groepen met pijnstilling krijgen een half uur voor operatie en 24 en 48 uur na operatie subcutaan carprofen (Rimadyl; 5 mg/kg lichaamsgewicht (6) ingespoten. De groepen zonder pijnstilling krijgen subcutaan een placebo (fysiologisch zout) toegediend. Carprofen is een COX-2 selectieve NSAID, een ontstekingsremmend geneesmiddel dat zowel een pijnstillend als koortsverlagend effect heeft. We hebben carprofen gekozen als peri-operatieve pijnstilling, aangezien carprofen een veel gebruikte pijnstiller bij standaardprotocollen bij lichte chirurgische ingrepen op ons laboratorium is. Uit literatuur is bekend dat carprofen een pijnstillende werking heeft (6) en de werking en dosering ervan zijn ook bij ons veelvuldig getest (maar de resultaten niet gepubliceerd).

Nazorg/welzijnscontrole

Tot tien dagen na de operatie worden de ratten individueel gescoord op activiteit, conditie van de vacht, herstel van de wond en beschadigingen van de (geopereerde) poot, ofwel het aanvreten hiervan (automutilatie). Ook worden de ratten dagelijks gewogen. Tien dagen na operatie worden de agraves verwijderd. Omdat het beoordelen van de ratten per persoon kan verschillen, zijn het steeds dezelfde mensen geweest die de ratten scoorden. Voor het scoren hebben we gebruik gemaakt van simpele scoringstekens; + = goed +/- = minder - = slecht, met ruimte voor aantekeningen over de eventuele automutilatie en andere abnormale bevindingen. Ratten met ernstig ongerief worden vroegtijdig uit het experiment gehaald. Onder ernstig ongerief verstaan we een negatieve score op automutilatie en/of meer dan 20% gewichtsverlies en/of ontsteking van de operatiewond. Deze punten gaan vaak gepaard met verminderde conditie van de vacht en verminderde activiteit. Voordat we een rat uit het experiment halen, wordt eerst de dierenarts geraadpleegd.

Cold plate

Om te kijken of de ratten neuropathisch gedrag vertonen, wordt gekeken naar thermische al-



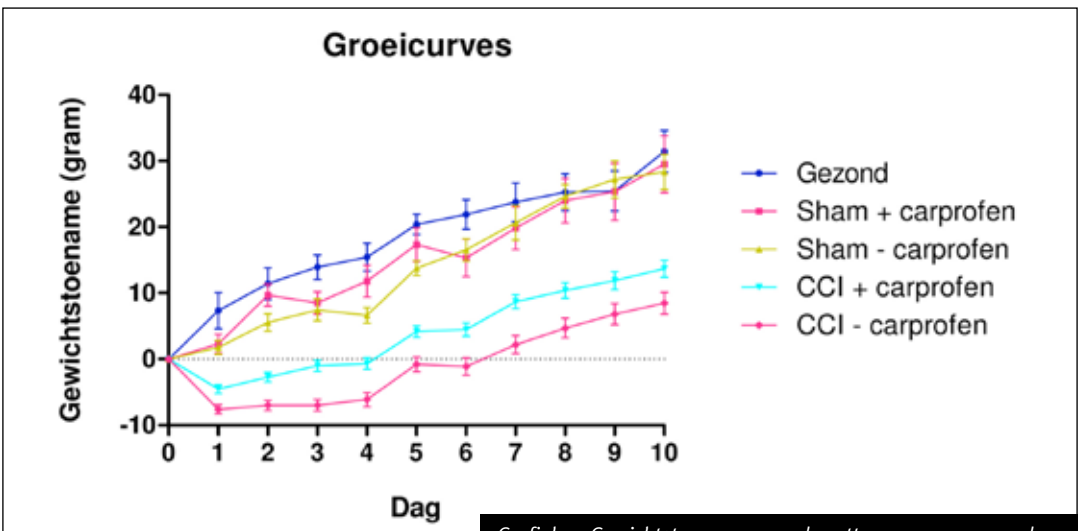
Afbeelding 3. Rat op coldplate van nul graden met de linkerachterpoot in een typische liftpositie. Toevallig is de linkervoorpoot ook gelift. Het dier vertoont normaal exploratief gedrag.

lodynie (temperatuurgevoeligheid) met behulp van een cold plate (Ugo Basile, Italië), een koude plaat van 3-4 graden. Ratten die neuropathisch zijn geworden, zullen deze temperatuur als pijnlijk ervaren in hun geopereerde poot en daardoor deze poot op gaan tillen (Afb. 3). Dit maakt de cold plate test een goede test (7) om het pijngedrag van de ratten te onderzoeken. Gedurende 5 minuten wordt gekeken naar het totaal aantal seconden dat een rat zijn geopereerde pootje optilt. Normaliter zal een rat op een koude plaat zijn pootje niet optillen als hij geen pijn voelt. Onder optillen verstaan we iedere

beweging die de rat maakt die abnormal is in vergelijking met zijn normale gedrag. Mocht een rat gaan krabben, lopen of wassen, dan tellen we dit niet mee. Als een rat gedurende 5 minuten zijn pootje in totaliteit 20 seconden of langer optilt, beschouwen we hem als dier met neuropathische gedragskenmerken. Wij hebben deze grens op 20 seconden gelegd, aangezien ratten die meer dan 20 seconden liften een robuuste neuropathie ontwikkeld hebben (8).

Deze cold plate test is uitgevoerd op de zesde dag na de operatie, waarop de neuropathie, indien de CCI-operatie geslaagd is, ontwikkeld zal zijn. Op basis van deze scores wordt het percentage ratten dat neuropathisch is geworden, bepaald.

Om de ratten vertrouwd te laten worden met de meetomgeving, worden ze in de habituatiweek twee keer 10 minuten op de cold plate gezet zonder dat hij aanstaat. Enkele dagen voor de operatie krijgen ze een premeting om uit te sluiten dat ze niet voor de operatie al reageren.



Grafiek 1. Gewichtstoename van de ratten per groep per dag.

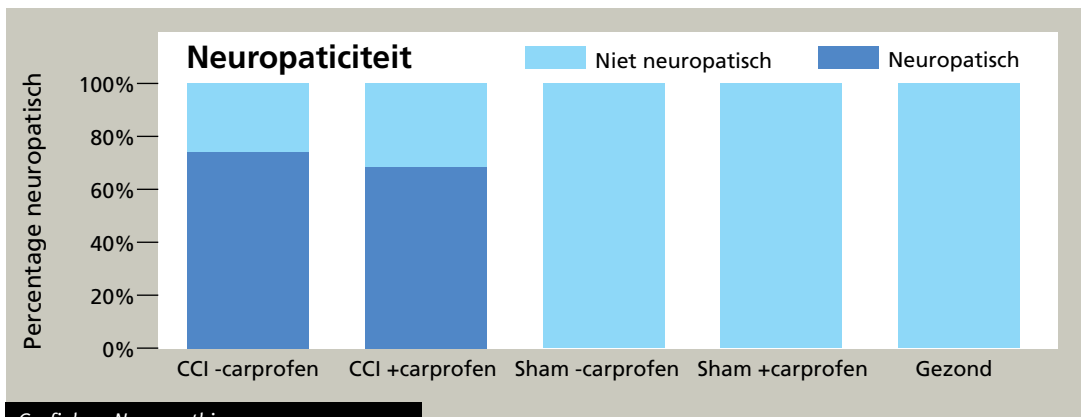
Resultaten

In Grafiek 1 zijn de gewichtstoenames van de verschillende groepen ratten na de operatie te zien. CCI-geopereerde ratten nemen in gewicht iets af na de operatie. Deze gewichtsafname is sterker in ratten die geen pijnstilling hebben gekregen. Ratten met pijnstilling zijn ook eerder »

weer op hun oude gewicht dan ratten zonder pijnstilling. Gezonde ratten en sham-geopereerde ratten vertonen geen afname in lichaamsgewicht en hebben een normale groeicurve.

Uit de welzijnscontrole blijkt dat er geen ratten zijn die een verminderde activiteit of een verminderde conditie van de vacht vertonen. Wel zijn er vier (van de 94) CCI-geopereerde ratten die beschadigingen hebben aan de geopereerde poot. Bij drie van die ratten betreft dit alleen de nagels, een rat hebben we vroegtijdig uit experiment gehaald omdat de beschadigingen te ernstig waren en de rat ernstige automutilatie vertoonde.

Ook is er gekeken naar het effect van de pijnstilling op het ontwikkelen van de neuropathie. Deze resultaten zijn weergegeven in Grafiek 2. Er zijn totaal 94 ratten CCI-geopereerd, waarvan er 53 pijnstilling hebben gehad en 41 niet. Van de 53 dieren met pijnstilling zijn er 37 neuropathisch geworden (69,8%). Van de dieren zonder pijnstilling zijn er 28 neuropathisch geworden (68,3%). De controle en sham-geopereerde dieren vertonen geen tekenen van neuropathie (liften niet). Dat wil zeggen dat ze hun linker achterpoot niet liften op de cold plate en deze poot ook normaal belasten. De gemiddelde lifttijd van de sham-geopereerde dieren zes dagen na CCI-operatie is $0,4 \pm 0,2$ seconden. De gemiddelde lifttijd van de controleratten (niet geopereerd) is nul. De gemiddelde lifttijd van de dieren met pijnstilling is $88,6 \pm 10,3$ seconden en die van de groep dieren zonder pijnstilling is $104,8 \pm 15,3$ seconden.



Grafiek 2. Neuropathieweergave per groep

Discussie en conclusie

Uit deze studie blijkt dat de toediening van carprofen als pre- en postoperatieve pijnstilling geen invloed heeft op de ontwikkeling van de neuropathie in het CCI-model in de rat. De mate van neuropathie is gemeten door middel van een cold plate test en de reactie op deze koude plaat is hetzelfde in ratten die wel en ratten die geen carprofen toegediend hebben gekregen rondom de operatie.

Ook blijkt dat toediening van carprofen pre- en postoperatief een verbetering voor het herstel van de dieren die een CCI-operatie hebben ondergaan, betekent. Deze conclusie trekken we op basis van de groeicurve van de gewichten. De stijging van de gewichten in de groep met pijnstilling in verhouding met de groep zonder pijnstilling zien we als maat voor herstel van de ratten. Hoewel de gewichten in de eerste paar dagen na de operatie in de CCI-groep met pijnstilling niet zo snel toenemen als in de sham-geopereerde en gezonde groepen, lijken deze dieren ten opzichte van de geopereerde dieren zonder pijnstilling toch minder ongerief te vertonen. De CCI-groep + carprofen en de CCI-groep - carprofen bereiken het gewicht van voor de operatie respectievelijk vier en zes dagen na de operatie. Daarna vertonen ze eenzelfde groeicurve als de controledieren en sham-geopereerde dieren. In deze studie hebben we gekozen voor carprofen als pijnstilling pre- en postoperatief bij de CCI-operaties. Bij soortgelijke, en zwaardere

operaties wordt vaak buprenorphine als pijnstilling toegediend, maar vanwege de bijwerkingen (o.a. vertraging van de darmperistaltiek) en de frequentie van toediening (3x per 24 uur), is hier gekozen voor carprofen. Een andere mogelijkheid zou nog kunnen zijn om meerdere pijnstillers tegelijk te gebruiken om de pijnbestrijding te optimaliseren. In de oorspronkelijke studie worden de effecten van verschillende doseringen morfine onderzocht. Dat is voor ons een reden geweest om in deze studie alleen een NSAID te gebruiken om de postoperatieve pijn te bestrijden. In vervolgstudies zouden we de mogelijkheid mee kunnen nemen om carprofen in combinatie met een opiaat als buprenorphine te gebruiken als pijnstilling rondom de operatie. Op die manier zou het ongerief voor de dieren wellicht nog verder kunnen dalen en ook het gewichtsverloop nog meer gelijk kunnen zijn aan dat van controledieren of sham-geopereerde dieren. Als extra parameter voor het ongerief, zou, naast het gewichtsverloop, ook gekeken kunnen worden naar het gedrag van de dieren net na de operatie, zoals bijvoorbeeld het bol zitten van de dieren, tandknarsen en/of het slecht verzorgen van de wond.

Pre- en postoperatieve pijnbestrijding komt gelukkig steeds meer in opmars tijdens operaties als deze. De resultaten van deze studie wijzen erop dat we de ratten rondom de operatie van adequate pijnstilling kunnen voorzien om zo hun ongerief te verminderen, zonder dat we daarmee het doel van de proef, het onderzoeken van neuropathische verschijnselen, belemmeren.

Literatuur

1. Bennet GJ, Xie Yk,(1988).A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33,: 87-177.
2. Shir Y, Ratner A, Raja SN,(1998). Neuropathic pain following partial nerve injury in rats is suppressed by dietary soy. *Neurosci letters*. 9;240(2):73-6.
3. Shir Y, Sheth R, Campbell JN, (2001). Soy-containing diet suppresses chronic neuropathic sensory disorders in rats. *Anesthesia analgesia*. 92(4):1029-34
4. Erdfelder E. Gpower: A general power analysis program. *Behavior Research Methods, Instruments & computers* 1996;18:1-11.
5. Daemen MA, Kurvers HA, Kitslaar PJ,(1998) Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain. *Neurol Res*. 20(1):41-5.
6. Roughan JV, Flecknell PA., (2001) Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90(1-2):65-74.
7. Jasmin L, Kohan L, Franssen M, (1998).The cold plate as a test of nociceptive behaviors description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75(2-3):367-82
8. Vissers KC, Adriaansen HF, De Coster RFJ, (2003) A chronic constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats : a behavioral and hormonal evaluation. *Anesthesia and Analgesia* 97 (2):520-5.

«

