

¹ Helicon Opleidingen, Nijmegen, ² Dierexperimenteel laboratorium Farmacologie & Toxicologie, Universiteit Maastricht, Maastricht, ³ Centrale Proefdiervoorzieningen, Universiteit Maastricht, Maastricht.

Dit onderzoek is uitgevoerd in het kader van een afstudeerstage (opleiding tot paraveterinair met differentiatie Biotechniek art. 12) van C. van Helvert bij het dierexperimenteel laboratorium van Farmacologie en Toxicologie. Het onderzoek is mede geïnitieerd door de leden van de dierexperimentencommissie (DEC) van de Universiteit Maastricht.

Pijnstilling

Als een dier is geopereerd kan het erna pijn hebben. Om de postoperatieve pijn te verlichten pas je pijnbestrijdingsmiddelen toe. Een middel dat veel wordt gebruikt is buprenorfine. Dit is een sterke pijnstiller die valt onder de opiaten. Het middel wordt vaak gebruikt omdat het een lange werkingsduur heeft (1). Buprenorfine wordt meestal via een subcutane injectie toegediend. Omdat een injectie pijnlijk is en stress geeft voor het dier (het dier moet gefixeerd worden; dit is vervelend na een operatie als de wonden nog niet volledig zijn geheeld) hebben we gekeken of het toedienen van buprenorfine niet op een andere manier kan. Flecknell en collega's hebben eerder bestudeerd hoe dit gedaan kan worden. Zij hebben bedacht om buprenorfine in gelatine met een smaakje te verwerken zodat de proefdieren het na de operatie zelf kunnen opeten (2). Dit is een vriendelijker manier en heeft geen andere invloed op de experimenten als na subcutane toediening (3). Bij ratten bleek deze manier van toediening goed te werken (2).

Over het effect van deze toepassing bij muizen is echter minder bekend. Daarom wilden we graag weten of ook muizen buprenorfine oraal opnemen en of het pijnstillende effect hetzelfde is als na een subcutane injectie. Als je een medicijn oraal toedient moet je er voor zorgen dat de dosis hoger is. Dit komt omdat, na opname door de darm, de lever eerst een groot deel van het buprenorfine afbreekt voordat het in de circulatie terechtkomt. Bovendien kan de opname van het buprenorfine worden geremd omdat morfine-achtige stoffen de darmactiviteit sterk remmen. Hoeveel de dosis verhoogd moet worden zullen we onderzoeken door middel van een vergelijking waarbij we gebruik maken van de zogenaamde 'hot plate'-pijntest (4). Dit werkt als volgt: de muizen worden een



uur nadat ze de pijnstiller toegediend hebben gekregen op een verwarmde plaat geplaatst. Deze plaat is 48°C. Er wordt gemeten hoelang het duurt voordat de muis aan zijn achterpoten gaat likken. Hoe langer een reactie uitblijft hoe beter het pijnstillende effect. De maximale tijdsduur die bij 48°C wordt toegestaan is 120 seconden (4) zodat er geen definitieve verbrandingen optreden. Door de resultaten van de 'hot-plate'-test te vergelijken na subcutane en orale toediening van buprenorfine kunnen we het pijnstillende effect van de orale toedieningswijze schatten.

Lekker?

Voordat dit allemaal onderzocht kan worden moet je natuurlijk wel weten of muizen de gelatine eten. Dit hebben we daarom als eerste getest. We hebben gelatine gemaakt en limonadesiroop toegevoegd. Om te kijken wat muizen het lekkerste vinden hebben we twee smaken geprobeerd, cassis en grenadine. We hebben vervolgens bij verschillende muizen twee plakjes cassis- en twee plakjes grenadine-gelatine in de kooien gelegd. We hebben de muizen geobserveerd en gekeken waar ze van aten. Alle muizen hebben alleen van cassis-gelatine gegeten. Hieruit blijkt dus dat ze cassismaak het lekkerst vinden. Hierna is er buprenorfine bij de gelatine toegevoegd. Hiervan hebben we een plakje in de kooi gelegd. Ook dit aten de muizen direct op. Ze vinden de gelatine met cassismaak dus lekker!

Het onderzoek

1 De testfase:

Toen we wisten dat de muizen de gelatine (jelly's) aten hebben we de 'hot plate'-pijntest in eerste instantie uitgevoerd bij drie muizen die geen pijnstiller op hadden om te bepalen na hoeveel tijd de dieren onder normale omstandigheden gaan reageren. Als het dier één keer aan zijn achterpoten had gelikt werd hij direct van de plaat gehaald. Deze drie onbehandelde muizen bleven zonder pijnstilling gemiddeld 54 seconden op de plaat zitten voordat ze aan hun achterpoten likten. Hierna hebben we bij drie andere muizen een uur nadat ze een jelly met buprenorfine (do-

sering 1,5 mg/kg) op hadden op de warme plaat gezet. Nu duurde het 92 seconden, ofwel bijna twee keer zo lang, voordat ze de achterpoten likten. Het 'snoepje' met buprenorfine bleek dus te werken.

2 Het echte experiment:

Omdat je uit één meting nog geen betrouwbare conclusies kunt trekken hebben we bij zes muizen op verschillende dagen een test gedaan. Hierbij werd het pijnstillende effect van oraal toegediende buprenorfine (1,5 mg/kg) vergeleken met het effect van subcutaan toegediende buprenorfine (0,1 mg/kg) en met een onbehandelde controlegroep (subcutaan 0,9% NaCl). We hebben de test bij alle dieren in een willekeurige volgorde uitgevoerd om voor mogelijke leer-effecten en gewenning (de muis 'weet' al wat er gaat komen) te corrigeren. Dit testje hebben we in drie groepen uitgevoerd, muis 1 en 2 kregen op dag 1 buprenorfine oraal, dag 2 subcutaan en dag 3 NaCl. Muis 3 en 4 begonnen met buprenorfine subcutaan, op dag 2 kregen ze NaCl en op dag 3 buprenorfine oraal. Muis 5 en 6 kregen op dag 1 NaCl, dag 2 buprenorfine oraal en op dag 3 buprenorfine subcutaan. In Tabel 1 zijn de resultaten van deze vergelijking opgenomen. Hieruit blijkt dat er grote variatie tussen de dieren onderling is en dat het buprenorfine wanneer het oraal wordt toegediend wel werkt, maar minder goed als na subcutane injectie.

Uit de tabel blijkt dat orale toediening van buprenorfine gemiddeld minder effectief was dan wanneer het subcutaan werd toegediend. We hebben het experiment herhaald bij 50°C (n=6). De maximale eindtijdsduur was nu op 60 seconden gesteld. Hierbij kwamen we ook uit bij een score van 77% voor het orale buprenorfine en 45% bij geen pijnstilling.

Een hogere dosering dan 1,5 mg/kg van buprenorfine in de jelly's is praktisch onmogelijk. Buprenorfine wordt alleen in een opgeloste vorm in een ampul aangeleverd (0,3 mg/ml). Bij deze hoogste dosering bestaat de jelly voor eenderde uit buprenorfine. Een hogere dosering bemoeilijkt het gieten van de gelatine. Helaas is buprenorfine moeilijk te verkrijgen in poedervorm waardoor we (nog) geen jelly's kunnen maken met hogere concentraties.

Verder kwamen we tijdens het experiment tot de ontdekking dat als je de jelly's meerdere dagen in de koelkast bewaarde ze een verminderde werking hadden. Na vier dagen (bij 4°C) is het buprenorfine zelfs totaal niet werkzaam meer (percentage bij de hotplate-test was nu slechts 38%). Om de jelly's te maken moet je ze wel een paar uur in de koelkast zetten om de gela-

tine te laten stollen. Na ongeveer vier uur is het noodzakelijk om ze uit de koelkast te halen. De rest van het experiment hebben we de jelly's buiten de koelkast bewaard. Als je de muizen vervolgens vier dagen oude (op kamertemperatuur bewaarde) jelly's geeft is het percentage 63%. De werking is dus wel verminderd. In de praktijk is het daarom het best de jelly's iedere dag vers te maken. We hebben ook nog een lagere dosering orale buprenorfine getest (0,45 mg/kg). Dit werkte echter ook niet erg pijnstillend en de gemiddelde score was nu 49%.

We hebben vervolgens de jelly's bij enkele geopereerde muizen getest. Deze dieren hadden een infarctoperatie ondergaan (afbinden van een coronaire arterie van het hart). Een dag na de operatie aten ze de jelly onmiddellijk op. De dieren vinden de jelly's heel lekker waardoor ze deze mogelijk zien als een beloning. Of de dosering voldoende is om alle postoperatieve pijn te bestrijden moet nog verder worden onderzocht. Dat de dieren zich er misschien ook wat fijner bij gaan voelen is dan alleen nog maar mooi meegenomen!

Conclusie

Met dit onderzoek is aangetoond dat het oraal toedienen van buprenorfine aan muizen wel mogelijk is maar mogelijk niet effectief genoeg is. De orale toediening van buprenorfine (in de concentraties die nu met de beschikbare oplossing haalbaar is) is minder effectief dan na subcutane toediening. Misschien is de 78% die nu gehaald wordt met een orale dosering van 1,5 mg/kg niet voldoende om pijn na een zware operatie voldoende te onderdrukken. Ten tweede haalden we de 78% alleen als we de jelly's iedere dag vers maakten. Ook is het duurder, je hebt meer tijd nodig om jelly's te maken dan het vullen van een spuit en je moet siroop en gelatine kopen. Maar het allerduurste is de hoeveelheid buprenorfine die je in een jelly moet stoppen, wil deze werkzaam zijn. Je moet minstens een vijftien keer zo hoge dosering toepassen dan bij subcutane injectie. Aangezien buprenorfine vrij prijzig is wordt op deze manier pijnstilling erg duur. Tijdens het onderzoek hebben we echter alleen gebruik kunnen maken van buprenorfine in ampulvorm. Wanneer we de beschikking krijgen over buprenorfine in poedervorm zal het onderzoek vervolgd worden met hogere concentraties en zal ook het welzijn van muizen postoperatief vergeleken worden bij orale en subcutane toediening van buprenorfine. Voorlopig blijven we daarom postoperatieve pijn met subcutaan toegediend buprenorfine bestrijden.

Literatuur

- 1 Gades NM, Danneman PJ, Wixson SK, Tolley EA (2000) *The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice*. *Contemp Top Lab Anim Sci* 39: 8-13.
- 2 Flecknell PA (1999) *Use of oral buprenorphine ('buprenorphine jello') for postoperative analgesia in rats a clinical trial*. *Lab Animals* 33:169-74.
- 3 Liles JH, Flecknell PA (1998) *Influence of oral buprenorphine, oral naltrexone or morphine on the effects of laparotomy in the rat*. *Lab Animals* 32:149-61.
- 4 Cristoph T, Kögel B, Schiene K, Méen M, de Vry K, Friderichs E *Broad analgesic profile of buprenorphine in rodent models of acute and chronic pain*. (2005) *Eur J Pharmacol* 507: 87-98.

Tabel 1. Uitslagen van de 'hot-plate' test bij plaattemperatuur 48°C. De tijd tussen plaatsing van de muis op de plaat en likken aan de achterpoot is uitgedrukt als percentage van de eindtijd (120 sec). Wanneer een dier na 60 sec aan zijn poot likte had deze een score van 50%. De methode is in detail beschreven in literatuurreferentie 4.

| | geen pijnstilling s.c. NaCl | buprenorfine s.c. 0,1 mg/kg | buprenorfine oraal via jelly 1,5 mg/kg |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| muis 1 | 87 | 120 | 101 |
| muis 2 | 56 | 116 | 92 |
| muis 3 | 25 | 115 | 101 |
| muis 4 | 42 | 120 | 103 |
| muis 5 | 89 | 120 | 100 |
| muis 6 | 95 | 120 | 60 |
| gemiddelde ± SD | 66 ± 29 | 119 ± 2 | 93 ± 17 |
| percentage | 55% | 99% | 78% |

Internationale prijzen voor proefdierkundige Bert van Zutphen

**Utrechtse emeritus hoogleraar
gelauwerd voor stimuleren
alternatieven dierproeven**

**Bert van Zutphen, emeritus
hoogleraar Proefdierkunde van de
Faculteit der Diergeneeskunde,
ontvangt op 24 augustus de Russell
& Burch Award en de Charles River
Laboratories' Excellence in
Refinement Award. Deze
internationale prijzen worden
toegekend aan een persoon die op
buitengewone wijze heeft
bijgedragen aan het ontwikkelen en
stimuleren van alternatieven voor
dierproeven en het bevorderen van
het welzijn van proefdieren.**

Professor Van Zutphen (1941) ontvangt deze awards vanwege zijn langdurige en diepgaande invloed op het welzijn van dieren door het trainen van wetenschappers en studenten in de principes van humaan

en verantwoord proefdiergebruik. Het intensieve onderwijsprogramma over proefdierkunde dat hij heeft ontwikkeld is ongeëvenaard. Het bepaalt de internationale standaard voor het trainen van studenten en wetenschappers in de humane zorg van proefdieren en het gebruik van alternatieven.

Van Zutphen

Bert van Zutphen heeft 35 jaar lang in belangrijke mate bijgedragen aan de ontwikkeling van het wetenschappelijk onderzoek op het gebied van de proefdierkunde. Ook heeft hij zich ingezet voor de vertaling van dit onderzoek naar het maatschappelijke debat. Dit is van grote betekenis geweest voor zowel de veterinaire als de humane geneeskunde. Voortdurend streefde hij naar verantwoord proefdiergebruik waarbij hij uitgebreid aandacht schonk aan en aandacht vroeg voor de mogelijkheden van de drie V's: vervanging, vermindering en/of verfijning (refinement) van het proefdiergebruik. Dit omwille van zowel het proefdier als de

kwaliteit van het onderzoek. Voor zijn verdiensten op dit gebied ontving hij eerder de Doerenkamp-Zbinden Award en een koninklijke onderscheiding in de Orde van de Nederlandse Leeuw.

Prijzen

De Russell & Burch Award wordt gesponsord door de Humane Society of the United States (<http://www.hsus.org/>) en de Charles River Laboratories' Excellence in Refinement Award door Charles River Laboratories (http://www.criver.com/humane_care/index.html) in samenwerking met het John's Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) (<http://caat.jhsph.edu/about-us/about-us.htm>). De prijzen worden uitgereikt tijdens het World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences in Berlijn (<http://www.ctw-congress.de/act2005>).

*Persbericht van de Universiteit Utrecht,
Faculteit der Diergeneeskunde*