

qBegeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-041

Versie 2006

Herziene versie

Ontvangen: 04-05-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
30-05-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot		

Hoofdproject		Hersenen en gedrag				
--------------	--	--------------------	--	--	--	--

Deelproject		3.				
-------------	--	----	--	--	--	--

Financieel beheerder		Budgetnummer	30070000N
----------------------	--	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Analgesie voor neonatale repetitieve naalden prikken: langdurige effecten

 startdatum 1-4-2011 einddatum ⁹ 1-4-2015 Duur van de proef ¹⁰: 65d

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoorde-lijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art.12 Art. 9	

Diergroep	1a	1b	1c	2	3a	3b	3c	4	5	6	7
ctrl/exp/sham	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Ctrl	Sham	Exp.	Moeders
Diersoort	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02	02
Stam	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley
Construct / mutatie ?	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec	Nec
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	31
Geslacht	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀ en ♂	♀
Dieren immuuncompetent ?	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸
Leeftijd/gewicht	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	Neonaat	13d drachtig zelfde leeftijd
Doel van de proef *	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04	04	04	04	01
Pijnbestrijding *	04	04	04	04	04	04	04	02	02	04	01
Mate ongerief *	05	05	05	05	05	05	05	05	05	05	01
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01	01	01	01	03

* VIII-coderingen zie bijlage

Diergroep	7										
ctrl/exp/sham	Pilot										
Diersoort	02										
Stam	Sprague-Dawley										
Construct / mutatie ?	Nee										
Herkomst (leverancier) *	01										
Aantal	6										
Geslacht	♀ en ♂										
Dieren immuuncompetent ?	ja										
Leeftijd/gewicht	Neonaat										
Doel van de proef *	32										
Belang van de proef *	01										
Toxicologisch onderzoek *	01										
Bijzondere technieken *	13										
Anesthesie *	04										
Pijnbestrijding *	04										
Mate ongerief *	05										
Toestand dier einde exp*	01										

* VHI-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Analgesie voor neonatale repetitieve naalden prikken: langdurige effecten

1. Doel van de proef.

De proef is een vervolg op het onderzoek gedaan onder DEC 2008-184 waarin aangetoond werd dat herhaaldelijke pijnlijke naaldenprikken in de achterpoot van de rat tijdens de eerste levensweek, de respons op een nieuw pijnlijk event op de leeftijd van acht weken verhoogt en permanente veranderingen in de anatomie van het pijnnetwerk in het ruggenmerg veroorzaakt (Knaepen *et al.* submitted).

Neonaten worden veelvuldig blootgesteld aan pijnlijke routine ingrepen in de *Neonatal Intensive Care Unit* (NICU) waarbij slechts in 30% van de gevallen enige vorm van analgesie wordt toegepast. Als analgesie in de NICU zijn er verschillende opties waarvan opioïden en paracetamol frequent worden gebruikt. Opioïden zoals morfine worden systemisch (i.v.) toegediend als pijnstilling in de NICU. Ademhalingsdepressie en verminderde GI-motiliteit zijn complicaties van veelvuldig morfine-gebruik in neonaten. Recent werd het gebruik van systemische (i.v.) paracetamol geregistreerd als een analgeticum voor neonaten. Naast systemische analgesie, wordt er gebruik gemaakt van lokale pijnstilling zoals EMLA (lidocaïne-crème).

Aangezien wij lange-termijn veranderingen hebben aangetoond na neonatale pijn, is het doel van het onderzoek analgesie toe te dienen tijdens de neonatale pijn-periode met als ultieme doel de lange-termijn effecten verminderen of zelfs voorkomen. De vraagstellingen van dit onderzoek zijn: 1. Kan subcutane toediening van morfine en/of paracetamol tijdens de naalden-prik periode de acute pijn van de naalden-prikken verminderen? 2. Is analgesie behandeling van naalden-prik pijn in staat de gekende veranderingen in de ruggenmerg anatomie en pijngevoeligheid te verminderen/voorkomen? 3. Kan paracetamol de morfine-behoefte voor pijnstilling bij neonaten verminderen? (Dus vermindering van de morfine-gerelateerde complicaties) 4. Is lokale analgesie effectief in het verminderen van naalden-prik pijn en zijn langdurige effecten?

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Het huidige toegepaste onderzoek heeft een sterke klinische relevantie aangezien pijnlijke herhaaldelijke routine procedures in neonaten in de NICU nog steeds onderbehandeld zijn. Dit onderzoek zal inzicht verwerven in de mogelijkheid van morfine, dan wel paracetamol of een combinatie van de twee de pijn van herhaaldelijke naalden prikken tijdens de eerste levensweek kan verminderen alsook de lange termijn effecten van neonatale pijnblootstelling in de NICU. De ontwikkelings-status van de neonatale rat komt overeen met een foetus in het derde trimester of een premature neonaat in de NICU, doch verschillen in metabolisme tussen mens en rat kunnen directe extrapolatiebaarheid verhinderen. De uitkomsten van deze studie kunnen echter wel een basis vormen voor een klinisch onderzoek in de NICU.

3. Alternatieven

In het huidige onderzoek naar analgesie als neonatale pijn-bestrijding en het effect op lange termijn pijngevoeligheid en ruggenmerg anatomie later in het leven is *in vivo* onderzoek noodzakelijk. Klinisch onderzoek is niet mogelijk aangezien dit een zeer lange follow-up inhoudt en informatie over ruggenmerg anatomie hiermee niet bekomen kan worden. Computermodellen zijn niet voorhanden voor dit soort onderzoek en *in vitro* systemen zijn ontoereikend vanwege hun gesimplificeerde karakter. Lagere diersoorten dan de rat zijn overwogen, maar deze zijn niet geschikt vanwege het feit dat hun zenuwstelsel, indien aanwezig, te ver afstaat van dat van de mens.

4. Ethische afweging

Niettegenstaande het dierlijke lijden dat binnen deze dieraanvraag plaatsvindt, zouden positieve resultaten die voortkomen uit deze studie kunnen leiden tot bijzonder waardevolle informatie over analgesie in de neonatale rat. Wij bevinden het huidige onderzoek als ethisch verantwoord, omdat de resultaten van deze studie een de basis kunnen vormen voor een klinische studie en uiteindelijk de analgesie in de NICU kan verbeteren.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Een recent review (Johnston *et al.* 2010) toonde aan dat neonaten nog steeds veelvuldig blootgesteld worden aan pijnlijke routine ingrepen in de *Neonatal Intensive Care Unit* (NICU) waarbij slechts in 30% van de gevallen enige vorm van analgesie wordt toegepast. Aangezien wij lange-termijn veranderingen hebben aangetoond na neonatale pijn, is het **doel** van het onderzoek analgesie toe te dienen tijdens de neonatale pijn-periode met als ultieme doel de lange-termijn effecten te verminderen of zelfs voorkomen.

Opioiden zoals morfine worden systemisch (i.v.) toegediend als pijnstilling in de NICU, met wisselende effectiviteit in het verminderen van pijn-scores (Durmeyer *et al.* 2010). Recent werd het gebruik van systemische (i.v.) paracetamol geregistreerd als een analgeticum voor neonaten (Hopchett *et al.* 2011). Het toedienen van paracetamol voor het verminderen van acute pijn blijkt verschillende resultaten op te leveren (Durmeyer *et al.* 2010).

Hoewel lokale anesthesie minder frequent gebruikt wordt in de NICU, werd er aangetoond dat het aanbrengen van een lidocaïne-bevattende zalf (EMLA) voor het uitvoeren van een circumcisie bij pasgeboren jongens, de pijnrespons op een standaard injectie enkele weken later verminderde (Taddio *et al.* 1997). Dit in tegenstelling tot jongens die geen EMLA kregen en een hogere pijnrespons hadden op de injectie in vergelijking met jongens zonder circumcisie. Er werd aangetoond dat enkel morfine met of zonder een lokaal anestheticum, maar niet enkel een lokaal anestheticum, de pijn van het prikken van een centrale lijn bij neonaten kan onderdrukken (Taddio *et al.* 2006). Dus lokale anesthesie blijkt in deze studies de lange termijn effecten van neonatale pijn, maar niet de acute pijn te verminderen. (Noot: Emla bevat per 1 gram crème 25 mg lidocaïne en 25 mg prilocaïne, werkingsduur ongeveer 2u.)

Experimenteel onderzoek naar analgesie voor pijnblootstelling in de NICU is beperkt en hieronder worden enkele voorbeelden besproken. Het systemisch toedienen van 2 mg/kg morfine 15 minuten voor en 5 uur na injectie van carrageenan, een pijnlijke inflammatoire substantie, in de achterpoot resulteerde in een omkering van de nadelige effecten later in het leven (Laprairie *et al.* 2008). Echter, neonatale poot-inflammatie heeft een beperkte klinische relevantie want "skin breaking procedures" en niet inflammatie zijn de meest belangrijke vorm van pijn in de NICU. Bovendien werd het acute pijnstillend effect van de morfine injectie op de pijn van de inflammatie niet gemeten in deze studie. Het acute effect van systemische morfine op neonatale pijn werd aangetoond met een s.c. injectie van 1 mg/kg morfine op formaline-geïnduceerde pijn in neonatale ratten (Abbott *et al.* 1995). In een dosis-respons studie werd aangetoond dat een dosis vanaf 0.5 mg/kg i.p. morfine al analgetisch werkt (Nandi *et al.* 2004). Echter, de lange-termijn effecten op pijngevoeligheid werden niet onderzocht in deze studies.

Experimentele studies naar de analgetische werking van paracetamol in neonatale ratten zijn zeer schaars (Green *et al.* 1984) en meestal enkel gericht op bepalen van de toxiciteit. Aangezien er geen dier-experimentele studies bekend zijn waarin paracetamol werd gebruikt voor het analgetisch effect in neonatale rat pups. Verder is het wel aangetoond dat paracetamol een lage toxiciteit op lever en nier-functie heeft en enkel in een hoge dosis van 1220 mg/kg (!) lethaal was na toediening aan rat-pups (Green 1984).

Daarom is het voorstel om een titratie van de paracetamol concentratie in een pilot-experiment uit te voeren waarbij we kunnen starten met de klinische therapeutische dosis.

De klinische therapeutische dosis: 30 mg/kg "loading dose" en 20 mg/kg "maintenance dose", met 12u interval (Hopchett *et al.* 2011) en deze wordt bij premature neonaten gebruikt.

In adulten is het bekend dat het toedienen van paracetamol de opioïde-behoefte verlaagt. Dit is echter nog niet aangetoond in neonaten.

In deze studie wordt een eerste experiment uitgevoerd waarin verschillende concentraties van morfine en paracetamol (beiden s.c. toegediend) afzonderlijk getest worden voor een pijnverminderend effect tijdens en ook na de naaldenprikken. Hierbij dienen vehicle-geïnjecteerde dieren als controles. In een tweede experiment wordt de ideale paracetamol concentratie gecombineerd met verschillende morfine dosissen om te onderzoeken of paracetamol de behoefte voor morfine voor acute pijnvermindering kan verminderen.

In een derde experiment wordt er onderzocht of een topicaal anestheticum, EMLA-crème, de acute pijn van de naaldenprikken en lange termijn gevolgen kan voorkomen.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol werd wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door het

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In dit onderzoek willen we gebruik maken van neonatale Sprague-Dawley ratten die frequent gebruikt worden in de dier experimentele studies in dit onderzoeksveld. Hiervoor zullen we zwangere ratten die 13 (of meer) dagen drachtig zijn, bestellen bij Charles River. Vanaf 12 dagen kan men immers de dracht pas met zekerheid aantonen. Deze moeders zullen ongeveer dezelfde leeftijd hebben. In sectie 7.c. zijn de proefdier-aantallen weergegeven. Nest-grootten worden gelimiteerd tot 10 pups om verschillen in groei van de pups te vermijden. Dit betekent dat extra pups bij andere moeders ondergebracht kunnen worden, of geëuthanaseerd worden. Dieren zijn allen dood in experiment. De moeders zullen na de spening van hun pups teruggebracht worden naar het CPV. Deze moeders worden niet opnieuw gedekt omdat we dezelfde omstandigheden van dracht willen bij alle experimenten (dus oa. transport van Charles River naar CPV). Dit om stress van de moeder tijdens het transport gelijk te hebben in alle experimenten. De experimenten worden elk twee weken tot een maand na elkaar gepland in de tijd en er zullen 3 moeders per tijdstip besteld worden.

Wanneer er genoeg pups bekomen zijn, worden er geen extra moeders meer besteld.

7b. Sexe

In het huidige onderzoek wordt er gekozen voor rat pups van beide geslachten, aangezien er geen substantiële geslachtseffecten aangetoond werden in vorige onderzoeken.

7.c. Aantallen

Een aantal van **216 ratpups** wordt aangevraagd voor dit onderzoek. ($n=21$ per groep, 10 groepen, $n=6$ voor de pilot)

Deze kunnen als volgt worden onderbouwd:

In alle onderzoeksvragen wordt de gebruikelijke powerberekening gebruikt (met een onderscheidingsvermogen van 80% en een onbetrouwbaarheid van de toets $\alpha = 0.05$) volgens de formule $n = 15.7 * (\sigma/\delta)^2$.

Onderzoeksvraagstelling:

Analgesie effectiviteit via gedragstesten (morfine en paracetamol diergroepen 1, 2 en 3):

Analgesie effectiviteit in rat pups wordt in de meeste studies gemeten als een stijging in drempelwaarden van de gouden standaard der pijn-testen, namelijk de von Frey test, welke ook in deze dierproef als belangrijkste pijn-test geldt.

Effect-grootte:

Bepaald met de laagste concentratie aan analgeticum die een pijnstillend effect geeft. Dit pijnstillend effect wordt gedefinieerd als een statistisch significante stijging in drempelwaarden met de von Frey test.

Een s.c. injectie van neonatale rat pups met 0,5 mg/kg morfine resulteerde 30 minuten later na in een significante stijging in de drempelwaarden met de von Frey test met een **effectgrootte van 9.5%** en een **spreiding van 10.2%** (Nandi *et al.* (2004)). Hieruit leiden we af dat met deze lage concentratie morfine pijnstilling bereikt wordt en het benodigde aantal proefdieren om zulke effectgrootte te bekomen, wordt hieronder berekend:

$$n = 15.7 * (10.2/9.5)^2 = 18.1$$

Uit het vorige experiment (DEC 2008-184) is gebleken dat uitval van ratpups met een frequentie van 1 dier per 10 dieren kan voorkomen (10% uitval).

$$\text{Dus } (a - 0.1a) = 18.1 \quad \text{of} \quad 0.9a = 18.1 \quad \text{of} \quad 18.1/0.9 = a \quad \text{Dus } a = 20.1 \rightarrow 21 \text{ ratpups/groep}$$

Gezien er voor paracetamol geen experimentele studies beschikbaar zijn, baseren we ons op de groeps-grootte van de morfine-geïnjecteerde dieren.

Voor de titratie van de paracetamol concentratie zal een **pilot-experiment** uitgevoerd waarvoor 6 ratpups aangevraagd worden, dit is het minimum aantal nodig om een uitspraak te kunnen doen.

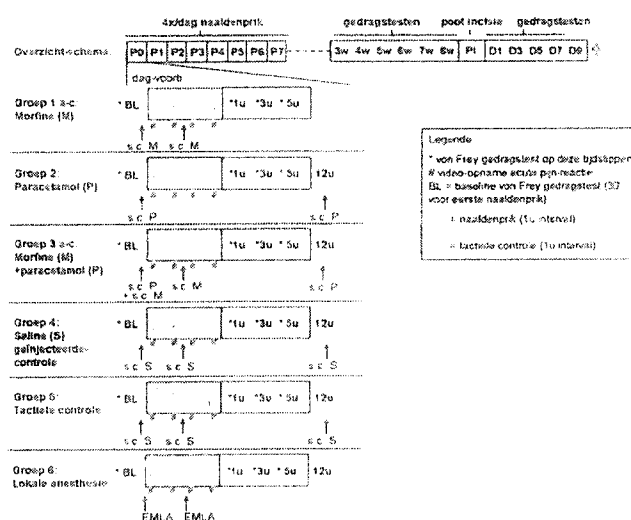
Aantal moeders:

Voor het bekomen van 21 ratpups per groep zijn er 3 moeders nodig per groep, gezien een gemiddelde nestgrootte van 8 pups en 1 moeder voor het pilot-experiment. Dus in totaal **31 zwangere ratten**.

8. Experiment

Flowchart van het experiment waarin het verloop van de volledige duur van het experiment in het overzichts-schema is weergegeven voor alle groepen en de verschillende dag-voorbeelden voor de afzonderlijke groepen.

De ratpups worden *at random* verdeeld over de verschillende groepen. De onderzoeker die de gedragstesten afneemt is **geblindeerd** t.a.v. de groepen.



Overzichts-schema: De verschillende dag-voorbeelden worden elke dag herhaald van P0 t.e.m. P7. Vanaf spening (3 weken oud) ondergaan de dieren wekelijks (1 dag/week, gedurende ongeveer 2u) gedragstesten. Na de laatste gedragstest in week 8 ondergaan de dieren een achterpoot-incisie als een model voor post-operatieve pijn. Na de achterpoot incisie ondergaan de dieren op bepaalde dagen gedragstesten (gedurende ongeveer 2u) tot 9 dagen na de incisie (D9), het tijdstip waarvan bekend is dat de post-operatieve pijn verdwenen is.

Dag-voorbeelden: De verschillende s.c. **morfine**-concentraties worden net na de baseline (BL) van Frey gedragstest geïnjecteerd. Dus ongeveer 25 minuten voor de eerste naaldenprik. De tweede morfine-injectie gebeurt net voor de 3^{de} naaldenprik. Morfine heeft een halfwaardetijd van ongeveer 2u.

Groep 1 a: 0.5 mg/kg morfine s.c., **groep 1b:** 1 mg/kg morfine s.c. **groep 1c:** 2 mg/kg morfine s.c.

Groep 2: Paracetamol wordt voor de eerste keer (30 mg/kg) net na de baseline (BL) van Frey gedragstest s.c. geïnjecteerd en de tweede keer (20 mg/kg) 12u na de eerste injectie (volgens klinische richtlijnen).

Groep 3a: Paracetamol wordt geïnjecteerd zoals in groep 2 en morfine 0.5 mg/kg, **groep 3b:** paracetamol en morfine 1 mg/kg, **groep 3c:** paracetamol en morfine 2 mg/kg.

Groep 4: Saline wordt 3 maal s.c. geïnjecteerd.

Groep 5: Tactiele controle groep die geen pijn ontwikkelt, saline wordt 3 maal s.c. geïnjecteerd.

Groep 6: Lokale anesthesie groep krijgt 15' voor de eerste en de derde naaldenprik EMLA-crème op de voetzool. (groep 1a, 1b, 1c, 2, 3a, 3b, 3c, 6: experimentele groepen, groep 4: controle groep en groep 5: sham groep)

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Voor de hind paw skin incision wordt anesthesie toegepast. Inductie middels de inductiebuis waarin de rat geplaatst wordt, met 3-4% isofluraan, met lucht als draaggas. Als de rat onder narcose is, wordt de rat aan het narcose kapje gelegd waarbij er wordt overgegaan naar 2,5 % isofluraan om de anesthesie te onderhouden.

9b. Pijnbestrijding

Er wordt behalve in de experimentele groepen nergens pijnbestrijding toegepast in deze proef omdat deze immers kunnen interfereren met de resultaten van de proef, omdat net het effect van het geven analgesie vergeleken wordt met het niet geven van analgesie.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie van dieren wordt uitgevoerd met een overdosis sodium pentobarbital (150 mg/kg; intraperitoneaal). De dieren worden geperfundeed (in geval van verdere histologische analyse) of direct afgevoerd naar de vriezer van CPV.

Humane eindpunten: gedurende de gehele studie wordt geëvalueerd of een dier **ernstige** vormen van ongerief vertoont (geen reacties meer op geluidssignalen, zich slap laten hangen na oppakken, zichzelf niet meer verzorgen (geen gladde huid meer), sterke gewichtsafname (meer dan 10%, en **gerelateerd aan de groeicurve**) en andere uiterlijke anomalieën vertonend, zoals overmatige beschadiging van de linker achterpoot. Dan zal euthanasie worden toegepast op de hierboven vermelde manier.

10a. Ongerief



Omschrijving frequentie, gevolgen/complicaties, duur en te verwachten ongerief van elke ingreep					Groep en markering van de toegepaste ingrepen											
Aard ingreep	Frequentie	Mogelijke gevolgen/complicaties	Duur ingreep	Te verwachten ongerief	1a	1b	1c	2	3a	3b	3c	4	5	6	7	
Naaldenprikken	4x/dag (1u interval) van P0-P7	Pijn, inflammatie, loopsteunbeperkingen	1 sec/prik	04	x	x	x	x	x	x	x	x		x		
s.c. injectie	2x/dag van P0-P7	weinig	Enkele min	01	x	x	x	x	x	x	x	x				
EMLA aanbrengen	2x/dag van P0-P7	weinig	Enkele min	01										x		
Neonatale von Frey	4x/dag van P0-P7	weinig, ev pijn	5 minuten	02	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Adulte gedragstesten	1x/week van 3w-8w	mogelijk pijn en stress	30 minuten	03	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Adulte gedragstesten	1,3,5, 7 en 9d na achterpootincisie	mogelijk pijn en stress	30 minuten	03	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Achterpoot incisie	1x op leeftijd van 8 weken	Inflammatie, loopsteunbeperkingen	± 30 min	05	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
i.p. injectie	1x voor perfusie	pijn	Enkele min	02	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Perfunderen	1x op het einde van het exp	weinig	15 min	02	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Totaal te verwachten ongerief					05	05	05	0	05	05	05	0	0	0	0	

10b. Welzijnsevaluatie

Van elk dier zal een welzijnsrapport worden bijgehouden.

11. Verzorging en huisvesting

De neonatale dieren uit deze studie worden gehuisvest bij de moeder in standaard bakken tot het moment van spening (P21). Na spening worden de dieren per twee gehuisvest volgens hetzelfde geslacht in standaard bakken tot het einde van het experiment. De dieren worden gehuisvest in een ruimte van CPV of de afdeling die gecontroleerd is voor temperatuur (19-24°C), luchtvochtigheid (55 ± 15%), licht-donker periode (dieren kunnen zowel op omgekeerd dag/nacht als op normaal dag/nacht ritme worden gehuisvest, maar moeten onder één van beide condities worden gehandhaafd gedurende het experiment) en achtergrondmuziek (zodat de dieren zo min mogelijk schrikken bij betreding van de ruimte). Bij calamiteiten gelieve (art. 9) of (art. 12) te contacteren.

12. Deskundigheid

Met betrekking tot de dierexperimentele ingrepen gaat het om naaldenprikken, maar ook om intraperitoneale en subcutane injecties, perfusies, gedragstesten en de hind paw skin incision ingreep. zijn bevoegd tot deze ingrepen volgens artikel 9 en artikel 12 () van de wet op dierproeven.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

De SOP van het naaldenprik model (met zijn negatieve controle), de gedragsexperimenten: Hargreaves-test en von Frey methode bij volwassen en neonatale dieren, de terminale anesthesie gevolgd door perfusie van de ratten, de hind paw skin incision (post-operatieve pijn model), de s.c. morfine en paracetamol injecties en de EMLA toediening zijn bijgevoegd.

Relevante literatuur

Johnston *et al.* 2010 Clin J Pain
 Durrmeyer *et al.* 2010 Pediatric Research, Vol. 67, No. 2
 Hopchett *et al.* 2011 Arch Dis Child
 Laprairie *et al.* 2008 Pediatric Research, Vol. 64, No. 6
 Abbott *et al.* 1995 Pain, Vol. 62
 Nandi *et al.* 2004 Pain, Vol. 111
 Green *et al.* 1984 Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 74
 Taddio *et al.* 1997 The Lancet, Vol. 349: 599-603
 Taddio *et al.* 2006 JAMA, Vol 295, No. 7

DEC 2011-041 (1)

Subcutane (s.c.) Morfine en Paracetamol injectie

Ratpups worden subcutaan (s.c.) geïnjecteerd tussen de schouderbladen met een volume van 10mL/kg. Er wordt gekozen voor een s.c. injectie omdat deze minder pijnlijk is dan een intra-peritoneale injectie. De rat-pups worden niet onder anesthesie gebracht, maar manueel gefixeerd. De huid tussen de schouderbladen wordt lichtjes opgetild en de vloeistof wordt geïnjecteerd met een insuline-spuut (30G naald). Hierna wordt de huid losgelaten en de pup terug bij de moeder geplaatst.

DEC 2011-041 (2)

Toedienen van de prikken en stimulatie met wattenstaafje (negatieve controle)

Volgens het diermodel van Anand *et al.* (1999) worden neonatale ratten viermaal daags geprikt in de voetzool van hun linkerachterpoot met een steriele 25-gauge naald met een tussentijds interval van één uur van de geboortedag (postnatale dag 0: P0) tot en met P7. De ratpups in de negatieve controle groep ondergaan dezelfde handelingen, maar in plaats van de naaldenprik, zal de achterpoot voetzool gestimuleerd worden met een wattenstaafje, als niet-pijnlijke stimulus. Het prikken gebeurt telkens op het midplantaire gedeelte van de voetzool van de achterpoot en de naald wordt snel ondiep (2 mm) in het midplantaire deel van de poot geprikt. Dit in tegenstelling tot Anand *et al.* waar de naald van dorsaal naar plantair volledig doorheen de poot geprikt werd, zulke pijnstimulus zien wij als onethisch en niet klinisch relevant. Hierna wordt eventuele bloeding gestelpt met een steriele gaas. Tijdens deze manipulaties zullen de ratpups even uit de kooi gehaald worden en daarna weer zo snel mogelijk terug bij de moeder gebracht worden om eventuele moeder-pup relatiestoornissen te vermijden. De pijnlijke respons (piepen en lichaams-bewegingen) worden geregistreerd met een videocamera.

Anand K.J.S. *et al.* (1999) *Physiosolgy & Behavior* 66: 627-37

DEC 2011-041 (3)

Hargreaves test (gedragstest)

In de Hargreaves test wordt de drempel bepaald van de terugtrek-respons van een poot na het toedienen van een thermische stimulus. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zogenaamde radiant heat source (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA). Het dier wordt in een plastic bak met glazen bodem geplaatst waarin ze vrij kunnen bewegen. Er wordt een acclimatisatieperiode van 10 minuten aangehouden, zodat de dieren rustig kunnen wennen aan de omgeving voordat ze getest worden. Daarna worden de thermische stimuli (via een laser) tegen het mid-plantaire oppervlak van de poot geplaatst door de glasplaat heen. Dit wordt overigens alleen gedaan wanneer de rat stil staat op de glasplaat. Meerdere temperaturen worden tegen het mid-plantaire poot oppervlak gebracht gedurende twee seconden. Het interval tussen opeenvolgende stimuli bedraagt minstens 5 seconden. Stimuli worden in een sterktoenemende volgorde toegepast en de stimulus met laagste intensiteit waarbij er uit vijf pogingen minstens drie maal een terugtrek-respons van de poot veroorzaakt wordt gezien als de drempel stimulus. De Hargreaves gedragstest wordt enkel bij toegepast bij dieren vanaf een leeftijd van 3 weken, aangezien deze gedragstest te schadelijk zou kunnen zijn voor de dunne huid van neonatale pups. Daarom wordt er gekozen voor de mechanische minder schadelijke stimuli voor het testen van pijndrempels in neonatale ratten.

DEC 2011-041 (4)

von Frey test (gedragstest)

Klassieke von Frey:

In de von Frey test wordt de drempel bepaald van de terugtrek-respons van een poot na het toedienen van een mechanische stimulus. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zogenaamde von Frey filamenten (Stoelting, Wood dale, IL) die variëren van 1.08 gram tot 21.09 gram. De dieren worden in een plastic bak met een metalen-raster-vloer geplaatst waarin ze vrij kunnen bewegen. Er wordt een acclimatisatieperiode van 10 minuten aangehouden, zodat de dieren rustig kunnen wennen aan de omgeving voordat ze getest worden. Daarna worden von Frey filamenten tegen het mid-plantaire oppervlak van de poot geplaatst door het metalen raster heen waar ze op staan. Dit wordt overigens alleen gedaan wanneer de rat stil staat op het metalen raster. Elk filament wordt tegen het mid-plantaire poot oppervlak gebracht totdat het filament net buigt en wordt gedurende 6-8 minuten in die positie gehouden. Het interval tussen opeenvolgende filamenten bedraagt minstens 5 seconden. Filamenten worden in een gewichtstoernemende volgorde toegepast en het laagste filament dat uit vijf pogingen minstens drie maal een terugtrek-respons van de poot veroorzaakt wordt gezien als de drempel stimulus.

Up-down methode (volgens Chaplan *et al.*):

Elk filament wordt tegen het mid-plantaire poot oppervlak gebracht totdat het filament net buigt en wordt gedurende 8-10 seconden in die positie gehouden. Het interval tussen opeenvolgende filamenten bedraagt minstens 5 seconden. Volgens de up-down methode van Chaplan *et al.* (1994) wordt een set van filamenten gebruikt: 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 15 en 26. Er wordt gestart met filament 2, indien hier een terugtrek-respons op volgt, wordt er een lager filament gebruikt. Indien er geen terugtrek-respons plaatsvindt, wordt er een hoger filament gebruikt. Na het waarnemen van de eerste positieve respons worden er nog 4 opeenvolgende metingen gedaan. Deze set van 5 metingen wordt weergegeven in een code, die dan ingevuld wordt in een wiskundige formule, waarvan de uitkomst een waarde oplevert die het gewicht van het filament waarop het dier de terugtrek respons vertoont. Deze formule zet de afstand tussen de opeenvolgende filamenten om naar een logaritmische schaal. Met deze methode is het mogelijk om de kracht (in g) waarbij de rat de terugtrek respons vertoont, beter te benaderen. Bovendien worden met deze methode een kleiner totaal aantal stimuli gebruikt dan met de klassieke von Frey methode.

Chaplan *et al.*, (1994) J Neuroscience Methods 53: 55-63.

Von Frey methode bij neonatale rat pups:

Voor het bepalen van pijndrempels bij neonatale ratten zijn verschillende protocollen beschreven in de literatuur: von Frey methode (zoals hieronder beschreven), thermische testen waarbij de pups op een hete plaat worden geplaatst en de tijd tot terugtrekken van de pootjes wordt gemeten en ten slotte EMG (elektrische doormeting van de spier) na toediening van von Frey filamenten. Aangezien in onze studie pijndrempels gemeten dienen te worden op verschillende tijdstippen na de naaldenprikken (1u, 3u en 5u) vinden wij enkel de von Frey methode als ethisch verantwoord, omdat deze het minst invasief is.

Methode:

Neonatale rat-pups worden op een vlakke tafel gezet en vastgehouden ter hoogte van de rug met de hand. Hierna worden elk filament in oplopende volgorde vijf maal toegediend aan de bovenkant (dorsale) gedeelte van de poot gedurende 1-2s. Een positieve respons wordt beschouwd wanneer de pup de poot terugtrekt en/of vocaliseert. Wanneer de pup bij de eerste drie toedieningen van een filament een positieve reactie vertoont, wordt dat als een maximale respons gescoord (5 op 5) en dit om het aantal pijnlijke responsen te verminderen. Deze procedure duurt ongeveer 5min per dier. De pijnreactie wordt tevens geregistreerd met een videocamera, voor scoring van vocalisatie.

Walker SM *et al.* (2009) Pain 147(1-3):99-106

DEC 2011-041 (5)

Intracardiale perfusie van muizen en ratten

De ratten worden terminaal onder anesthesie gebracht met behulp van een intraperitoneale overdosis sodium pentobarbital (150 mg/kg). Na een vijftal minuten wordt er aan de hand van knijpjes in de voet met een pincet nagegaan of het sedatief reeds voldoende werkzaam is. Als er nog een pijnrespons

waargenomen wordt, zal het knippen in de voet op regelmatige tijdstippen herhaald worden totdat er geen pijnrespons meer kan worden waargenomen. Dit kan tot 20 minuten na sodium pentobarbital injectie duren.

De rat wordt nadien op de rug gelegd waarna de huid van de ribbenkast verwijderd wordt. De ribbenkast wordt dan opgeknijpt om het hart bloot te leggen. Om dit te vergemakkelijken wordt ook het diafragma verwijderd. Vervolgens wordt er een klein knipje in het rechter atrium gemaakt waarna een naald in de linker ventrikel wordt geplaatst (18G). Deze naald is via een slangensysteem met een pomp verbonden. Het bloed wordt dan eerst onder druk (40 mbar) uit het lichaam gespoeld met behulp van ongeveer 100 mL tyrode oplossing (0.1 M fosfaatbuffer, pH 7.4) op kamertemperatuur. Daarna vindt de eigenlijke fixatie onder druk (70 mbar) plaats met ongeveer 300 mL perfusiebuffer. Als de spieren voldoende gefixeerd zijn, en dus hard aanvoelen, worden ze onmiddellijk verwijderd en in de gebruikte perfusiebuffer bewaard. De carcassen worden bij -20°C op het CPV bewaard.

DEC 2011-041 (6)

SOP Post-operatieve pijn model (hind paw skin incision)

De anaesthesie wordt geïnduceerd middels de inductiebuis waarin de rat geplaatst wordt. Anaesthesie inductie vindt plaats met 3-4% isofluraan, met lucht als draaggas. De diagnose 'onder narcose' wordt gegeven als bij de rat de reflex die optreedt na het knippen in de tenen verdwenen is. Als de rat onder narcose is, wordt de rat aan het narcose kapje gelegd waarbij er wordt overgegaan naar 2,5 % isofluraan om de anaesthesie te onderhouden. De rat ligt nu op een verwarmde plaat (37°C) om afkoeling tegen te gaan en zal hier gedurende de hele ingreep op liggen. Er wordt dan oogdruppels toegediend om deze tegen uitdroging te beschermen tijdens de operatie. Een midline-incisie wordt gemaakt aan de plantaire kant van de achterpoot van de rat door de huid en de fascia. Vervolgens wordt de musculus plantaris met een pincet omhoog getild en longitudinaal ingesneden met een scalpel over een afstand van ongeveer 1 mm. De huid wordt vervolgens met 5-0 nylon hechtdraad gehecht (Ethicon, Somerville, New Jersey).

Wanneer de wond goed gehecht en ontsmet is, wordt het anaesthesie apparaat ingesteld op de 0% isofluraan, zodat de rat uit de narcose kan ontwaken. Ontwaken uit de inhalatie narcose treedt in het algemeen zeer snel op (minuten). Als het dier is bijgekomen wordt het in papier gewikkeld (om warmteverlies tegen te gaan) en in zijn kooi teruggelegd om te kunnen herstellen.

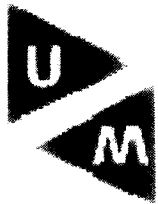
DEC 2011-041 (7)

EMLA-crème applicatie

De voetzool van rat-pups wordt ingesmeerd met EMLA-crème volgens de bijsluiter:

“Bij kinderen van 0-2 maanden mag de totale hoeveelheid Emla niet meer dan 1 gram bedragen en het totaal in te smeren oppervlak mag niet groter zijn dan ongeveer 10 cm².”

Dit gebeurt 30min voor de eerste en 30 min voor de derde naalden-prik omdat EMLA een werkingsduur van ongeveer 2u heeft. Na intrekken van de crème wordt de pup terug bij de moeder geplaatst.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie : *

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Analgesie voor neonatale repetitieve naalden prikken: langdurige effecten*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC verzoekt het privételefoonnummer van de vervangend verantwoordelijke onderzoeker te vermelden op het voorblad.
- * Bij punt 6 verzoekt de DEC het woordje "eerder" te verwijderen en verzoekt erbij te vermelden dat dit DEC protocol wetenschappelijke beoordeeld en goedgekeurd is.
- * De DEC vraagt zich af of de dosering van de paracetamol van de neonaten wel te relateren is aan de humane waarden. De DEC verzoekt hierover contact op te nemen met de proefdierdeskundige.
- * De DEC gaat er vanuit, dat als er voldoende pups zijn, er niet meer moeders worden besteld.
- * Bij punt 8 wil de DEC graag weten wat het verschil is tussen de dosering paracetamol en morfine van de groepen 3b en 3c.
- * Bij punt 9c verzoekt de DEC het woordje "extreme" aan te passen in "ernstige" vormen.
- * De DEC merkt op dat de gewichtsafname (punt 9c) gerelateerd dient te worden aan de groeicurve.
- * Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst "weinig" van de adult gedragstesten (1x/week), aan te passen in "mogelijk pijn en stress" en het ongerief van deze handeling schat de DEC in op code 03.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en **duidelijk de aanpassingen grijs te markeren**.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-041, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 04-05-2011

Beste leden van de DEC,

Naar aanleiding van jullie wijzigingsbrief (zie bijlage 1) met de beslissing over projectaanvraag: "*Analgesie voor neonatale repetitieve naalden prikken: langdurige effecten*" (nu bekend als DEC 2011-041) besproken tijdens de DEC vergadering van 25 maart 2011, geef ik in de huidige brief antwoord op de gestelde vragen. Alle vragen zijn letterlijk overgenomen uit jullie brief en aangeduid met bulletpoints (*), de antwoorden zijn eronder weergegeven in *cursief*.

Ik hoop hierbij de vragen voldoende beantwoord te hebben. Indien dit niet het geval is, wil ik graag meer uitleg geven.

Met vriendelijke groeten,

De DEC heeft een aantal  opmerkingen:

- * De DEC verzoekt het privételefoonnummer van de vervangend verantwoordelijke onderzoeker te vermelden op het voorblad.

Het privételefoonnummer van de vervangend verantwoordelijke onderzoeker werd bijgevoegd op het voorblad en gemarkeerd in grijs.

- * Bij punt 6 verzoekt de DEC het woordje "eerder" te verwijderen en verzoekt erbij te vermelden dat dit DEC protocol wetenschappelijke beoordeeld en goedgekeurd is.

Bij punt 6 staat er nu geschreven: "Dit DEC protocol werd wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd..."

- * De DEC vraagt zich af of de dosering van de paracetamol van de neonaten wel te relateren is aan de humane waarden. De DEC verzoekt hierover contact op te nemen met de proefdierdeskundige.

Na overleg met de proefdierdeskundige (voor correspondentie zie Bijlage 2), kan het volgende antwoord gegeven worden:

Aangezien er geen dier-experimentele studies bekend zijn waarin paracetamol werd gebruikt voor het analgetisch effect in neonatale rat pups. Verder is het wel aangetoond dat paracetamol een lage toxiciteit op lever en nier-functie heeft en enkel in een hoge dosis van 1220 mg/kg (!) lethaal was na toediening aan rat-pups (Green 1984).

Daarom is het voorstel om een titratie van de paracetamol concentratie in een pilot-experiment uit te voeren waarbij we kunnen starten met de klinische therapeutische dosis.

De klinische therapeutische dosis: 30 mg/kg "loading dose" en 20 mg/kg "maintenance dose", met 12u interval (Hopchett et al. 2011) en deze wordt bij premature neonaten gebruikt.

Dus er werd een diergroep toegevoegd op het voorblad, nl. groep 7 pilot, met daarin 6 dieren.

Hiervoor is dan ook 1 extra moeder nodig, dewelke werd toegevoegd aan het aantal moeders, dus van 30 naar 31 moeders (gemarkeerd in grijs op het voorblad). Ook bovenstaande uitleg staat in het DEC document bij punt 5 in grijs gemarkeerd.

- * De DEC gaat er vanuit, dat als er voldoende pups zijn, er niet meer moeders worden besteld.

Wanneer er voldoende pups zijn worden er inderdaad geen moeders meer besteld. Dit is nu ook vermeld bij punt 7a en gemarkeerd in grijs.

- * Bij punt 8 wil de DEC graag weten wat het verschil is tussen de dosering paracetamol en morfine van de groepen 3b en 3c.

Hier gebeurde een vergissing in plaats van morfine 1 mg/kg en paracetamol voor groep 3b en 3c, moet er staan:

"groep 3b: paracetamol en morfine 1 mg/kg, groep 3c: paracetamol en morfine 2 mg/kg" Dus groep 3b krijgt de middel-dosis morfine 1 mg/kg en groep 3c krijgt de hoogste dosis 2 mg/kg in combinatie met paracetamol. Dit werd aangepast bij punt 8 en gemarkeerd in grijs.

- * Bij punt 9c verzoekt de DEC het woordje "extreme" aan te passen in "ernstige" vormen.

Bij punt 9c werd het woordje "extreme" vervangen door "ernstige" en gemarkeerd in grijs.

- De DEC merkt op dat de gewichtsafname (punt 9c) gerelateerd dient te worden aan de groeicurve.

Bij punt 9c staat nu geschreven "sterke gewichtsafname (meer dan 10%, en gerelateerd aan de groeicurve)" en tevens gemarkeerd in grijs.

- Bij punt 10a verzoekt de DEC de tekst "weinig" van de adult gedragstesten (1x/week), aan te passen in "mogelijk pijn en stress" en het ongerief van deze handeling schat de DEC in op code 03.

Bij punt 10a werd de tekst "weinig" vervangen door "mogelijke pijn en stress", waarbij de ongerief code veranderd werd naar 03. Deze vervangingen gebeurden in de tabel en werden gemarkeerd in grijs.

Bijlage 2: Correspondentie met de proefdierverantwoordelijke

From:

Sent: dinsdag 3 mei 2011 13:35

To:

Subject: RE: Project 2011-041-w

Lijkt me een goed idee

Groeten

CPV, animal welfare officer

POB616, 6200MD Maastricht, The Netherlands
P.O. Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands
T
M

Note: the email addresses have changed!

Please consider your environmental responsibility before printing this e-mail.

From:

Sent: woensdag 27 april 2011 16:35

To:

Subject: RE: Project 2011-041-w

Beste

Ik kan nog steeds geen literatuur vinden over het toedienen van i.v. paracetamol specifiek bij neonatale rat pups.

Wat bedoelt u precies met het gebruiken van het metabool gewicht voor de omzetting?

Het artikel over de i.v. injectie kijkt helaas niet naar analgesie.

De literatuur van Mickley en Bauer et al. gaan voornamelijk over het effect van orale toediening van paracetamol voor het bestrijden van post-operatieve pijn. Meer bepaald, dat de dieren sub-effectieve dosissen van paracetamol innemen omwille van de slechte smaak ervan (Bauer et al. 2003). In deze studie ging het echter om naïve dieren die geen pijn hadden en waarbij er niet gemeten werd of de pijndrempels veranderden.

Mickley et al. 2008 heeft aangetoond dat naïve ratten inderdaad minder van het paracetamol-water drinken, maar toch nog een stijging in pijn thresholds vertoonden en dat ratten die een operatie ondergingen nog meer van het paracetamol-water drinken. Zie hieronder.

"Previous studies have suggested that the addition of flavored acetaminophen suspension (for example, Children's Tylenol) in the drinking water of rats may not be effective in producing postoperative analgesia because of low levels of consumption. However, these investigations neither measured analgesia nor compared the consumption by rats that had undergone surgery with that by unmanipulated rats. The present study reports that although unmanipulated rats naïve to the taste of flavored acetaminophen do indeed drink significantly less of this liquid than tap water, they drank sufficient amounts of the

acetaminophen-containing solution to significantly raise pain thresholds, as measured by the hot-plate test. Moreover, rats that had undergone surgery drank significantly more acetaminophen solution than did those that had no surgery. These data suggest that oral self-administration of flavored acetaminophen by rats may be an appropriate means to reduce pain."

Mijn voorstel is nu om eerst een pilot-studie te doen waarin door middel van titratie de analgetische dosis bepaald kan worden in neonatale ratten die pijn hebben oww de naaldenprikken. Wat zijn uw bedenkingen hierover?

Met vriendelijke groeten,

postal address:
Maastricht University

The Netherlands

telephone: -

fax:-

Van:

Verzonden: dinsdag 26 april 2011 11:44

Aan:

Onderwerp: RE: Project 2011-041-w

Beste

Waar het om gaat is dat je niet per definitie een humane dosis mag/ kan extrapoleren naar een dosis voor het dier (ook tussen diersoorten kan er een groot verschil in dosis bestaan). Als je echt geen literatuur vindt, gebruik je het metabool gewicht voor de omzetting.

Dosissen voor de rat:

Paracetamol dosis rat: 200mg/kg LG per os.

Artikel over IV injectie: Dose-dependent biliary and renal excretion of paracetamol in the rat. Siegers CP, Schütt A. Geen toxisch effect waargenomen bij 25-100-400mg/kg LG IV injectie (weet niet hoe lang ze het hebben gegeven, is oud artikel)

Heb geen specifieke dosis gevonden voor injectie bij neonatale pups

Er is veel discussie in de literatuur over het analgetisch effect bij ratten en muizen:

Geen bewezen effectieve goede analgesie.

Muis :Miranda et al 2008,

Rat : Mickley et al 2006, Bauer et al 2003

Groeten

POB616, 6200MD Maastricht, The Netherlands
P.O. Box 616, 6200 MD Maastricht. The Netherlands

Please consider your environmental responsibility before printing this e-mail.

From:
Sent: donderdag 21 april 2011 15:05
To: 'V)
Subject: FW: Project 2011-041-w

Beste

Ik stuurde een tijdje geleden onderstaande email in verband met de vraag van de DEC over de dosering van paracetamol. Moeten wij dit nog verder bespreken met elkaar?

Groeten,

Maastricht University
postal address:
Maastricht University

telephone:

fax:

Van:
Verzonden: maandag 4 april 2011 16:47
Aan:
Onderwerp: FW: Project 2011-041-w

Beste

De DEC verzocht mij contact op te nemen met jou in verband met de concentratie paracetamol die wij willen toedienen in neonatale rat-pups.

Hierbij kan ik nog volgende toelichting geven:

Paracetamol heeft een lage toxiciteit op lever en nier-functie en werd enkel in een enkele experimentele studie gebruikt, waarin werd aangetoond dat een hoge dosis van 1220 mg/kg (!) lethaal was (Green 1984). Aangezien er geen andere dier-experimentele studies bekend zijn over de dosering van paracetamol bij rat-pups kozen wij voor de klinische dosis (30 mg/kg inleiding en 20 mg/kg onderhoudsdosis, met 12u interval) die bij premature neonaten gebruikt wordt.

Heb jij hier nog suggesties/vragen/opmerkingen voor, dan hoor ik het graag. Ik kan ook langskomen hiervoor.

Groeten,

Maastricht University
postal address:
Maastricht University

telephone:

fax: +

Van:

Verzonden: dinsdag 29 maart 2011 9:57

Aan:

Onderwerp: Project 2011-041-w

Geachte onderzoeker,

Uw projectaanvraag is in de DEC-UM -- vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De uitslag treft u aan in bijgaand attachment.

Voortaan zult u uit efficiency overweging geen schriftelijke bevestiging meer ontvangen per post wanneer het een wijzigingsbrief betreft.

De DEC verzoekt U in een brief de vragen van de DEC te beantwoorden en de wijzigingen in het protocol duidelijk te vermelden, zodat het bij het kopiëren ook zichtbaar is.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk secretaris

I

Postbus 616- , 6200 MD Maastricht T

E-mail:

Werktijden.

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
30-05-2011

Project: *Analgesie voor neonatale repetitieve naalden prikken: langdurige effecten.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een positief advies.

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-041

Postadres

Diersoort: rat

Postbus 616

Aantal dieren: 31 moeders- 210 pups en 6 dieren voor de pilot

6200 MD Maastricht

Einddatum: 30-05-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM