



Het belang van blinderen en randomiseren in dierexperimenteel onderzoek

Ivo Tiebosch en Robin van Eenige

*Ivo Tiebosch, IvD Utrecht, en Robin van Eenige, LUMC.
E-mail: I.A.C.W.Tiebosch@uu.nl; R.van_Eenige@lumc.nl*

Blinderen en randomiseren

Bijna elke onderzoeker krijgt het als belangrijke voorwaarde van goed onderzoek met de paplepel ingegeven. Toch is de praktijk weerbarstig en blijkt dat maar weinig onderzoekers het toepassen en nog minder dit rapporteren.

Wanneer onderzoekers wel blinderen en randomiseren, doen zij dit soms onvolledig of onzorgvuldig. Dat is jammer, vooral nu systematisch onderzoek aan het licht heeft gebracht dat deze onzorgvuldigheid bijdraagt aan de replicatiecrisis in dierexperimenteel onderzoek. In dit artikel geven wij een kort overzicht van de historie, beschikbare gegevens, mogelijkheden en oplossingen wat betreft blinderen en randomiseren. Het onderwerp is relevant voor iedereen die meewerkt aan dierexperimenteel onderzoek, want iedereen kan verbetering realiseren. De waarde die dierproeven hebben, is de verantwoordelijkheid van ons allemaal, van subsidieverstrekker tot professor tot verzorger.

De wens, als vader van onze gedachte

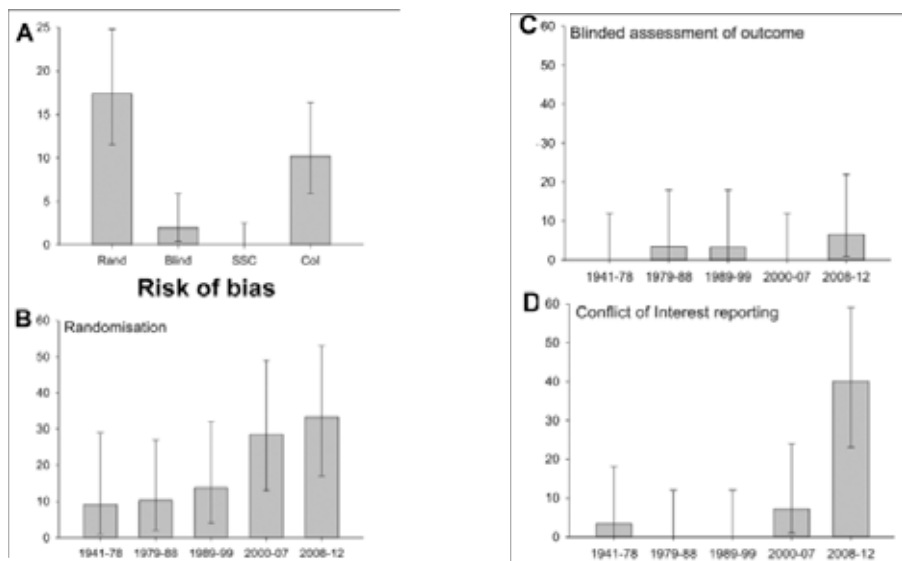
Betrouwbaar meten op een wijze die je kunt herhalen is een van de basisprincipes van onderzoek. Voor de wetenschap is het van belang dat kennis wordt verkregen op een geordende en controleerbare manier. Je kunt met een geordende werkwijze misschien wel fouten maken, maar die kun je later niet meer herhalen of controleren. Fouten maken zit in ons mensen. Wij zien namelijk graag de informatie die we willen zien of horen wat we willen horen. "De wens is de vader van de gedachte" luidt een bekend spreekwoord. Dit maakt ons selectief in wat we lezen en horen, een verschijnsel dat *confirmation bias* heet. En sinds wij ons realiseren dat dit een probleem is, geeft alles wat we lezen ons daarin gelijk. *Confirmation bias* kan extreme vormen aannemen. Er zijn mensen die opstapelend bewijs hebben gelezen en gehoord dat klimaatverandering niet kan gebeuren. Toch lijkt de kans groot dat klimaatverandering een reëel gevaar is, als je de informatie systematischer bekijkt. De wens vader van je gedachte laten zijn en selectief lezen kunnen ook in de wetenschap gevaarlijk zijn. Recentelijk noemde Ritskes-Hoitinga in haar oratie voorbeelden uit dierexperimenteel onderzoek: humane studies die werden aangevraagd op basis van selectief gepresenteerde dierstudies.[1]. Hoitinga heeft gelukkig ook al een bijdrage geleverd aan de oplossing: via systematische studies het totaal van gegevens verzamelen over een onderwerp, om zo de juiste conclusie te trekken. Meer »

informatie hierover kun je vinden bij de organisatie SYstematic Review Center for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) in Nijmegen. Die bracht ook een interessante animatie uit over dit onderwerp.[2].

We zijn niet alleen selectief in het lezen en horen van informatie. Ook tijdens het doen van metingen is confirmatie bias een gevaar. Een bekende studie die vaak wordt genoemd als het begin van bewustzijn hierover in dierexperimenteel onderzoek, is het onderzoek van Robert Rosenthal en Kermit L. Fode.[3]. Zij leverden als eerste systematisch bewijs door studenten verschillen te laten onderzoeken tussen *maze-bright* (labyrint-slimme) en *maze-dull* (labyrint-domme) ratten. Een dertiental studenten vond verschillen tussen deze twee groepen ratten bij het doen van testen gericht op het leervermogen. Vooraf was aan de studenten verteld welke dieren als *maze dull* waren gefokt en welke als *maze bright*. De studenten vonden vervolgens in lijn met die voorinformatie significante verschillen tussen de twee groepen, terwijl de dieren in werkelijkheid totaal willekeurig uit één en dezelfde populatie kwamen, enkel gematcht op leeftijd. De onderzoekers bleken dus in staat om het waarnemingsvermogen van de studenten bij te sturen. Wanneer de te vinden verschillen subtiel werden gesuggereerd, kwamen ze vanzelf aan het licht, of ze nu daadwerkelijk bestonden of niet.

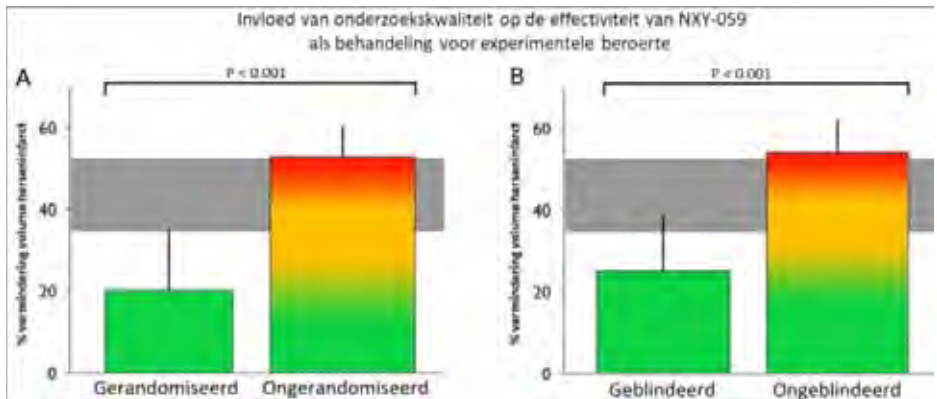
Effecten op onderzoek

De vraag is of deze vervormingen in wat we waarnemen ook echt een effect hebben op resultaten van het huidige wetenschappelijk onderzoek. Door dit te onderzoeken, krijgen we inzicht in de grootte en realiteit van dit probleem. Dit soort systematische onderzoeken worden steeds vaker gedaan, onder andere door de 'Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies' (CAMARADES) [4]. In deze onderzoeken is een aantal kwaliteitscriteria meegenomen, waaronder het wel of niet rapporteren van auteurs dat ze geblindeerd onderzoek doen en de dieren gerandomiseerd inzetten. Twee andere



Afbeelding 1: Percentages van studies dat randomiseren (Rand), blinderen (Blind), de bepaling van aantal dieren (SSC) en/of mogelijk belangenverstremgeling (Col) benoemd in een steekproef van 146 willekeurig geselecteerde biomedische artikelen die studies met gebruik van dieren beschrijven. A geeft het totaal overzicht, B, C en D een detailuitwerking van respectievelijk blinderen, randomiseren of conflict van interesse in de verschillende tijdsperiodes weergegeven onder de x-as (Herpublicatie onder creative commons [4].

»

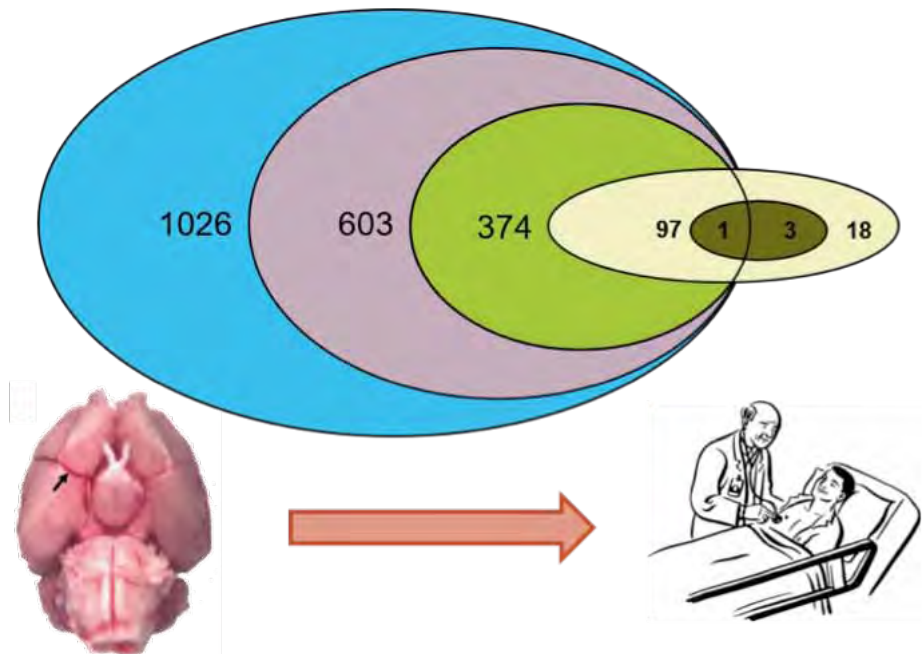


Afbeelding 2. Invloed van randomiseren (A) en blinderen (B) op de effectiviteit van een behandeling met het experimentele middel NXY-059 op geïnduceerde lokale hersenberoertes gemeten in 11 totaal beschikbare studies. In grijs het 95% betrouwbaarheidsinterval van alle studies samen. Weergegeven is steeds de vermindering van het volume van het infarct als gevolg van de behandeling tegen controle. Met de kleuren geel en rood wordt de interpretatie aangegeven dat er mogelijk overschatting is van de effectiviteit als gevolg van bias. (Gemodificeerd vanuit MacLoad et al. [6])

kwaliteitscriteria zijn de manier waarop is weergegeven hoe het aantal gebruikte dieren is berekend (sample size calculation) en afwezigheid van belangenverstrengelingen (conflict of interest). De mate waarin aan deze kwaliteitscriteria wordt voldaan, is helaas bedroevend, zoals is weergegeven in afbeelding 1.

Dat dit ook geldt bij onderzoeken in Nederland heb ik (I.T.) aan den lijve ondervonden toen ik in 2006 mijn promotieonderzoek begon. Ik had toen al een tijdje onderwijs gegeven en daarin (net zoals ik dat zelf bij mijn eigen opleiding had geleerd) het belang van blinderen en randomiseren uitgelegd. De praktijk waar ik in terecht kwam, negeerde deze boodschap echter en deed in de regel vaker ongeblindeerd en ongerandomiseerd onderzoek dan andersom. Gelukkig vond mijn co-promotor het goed dat ik wél op deze wijze onderzoek wilde doen. "Maar", waarschuwde hij, "je loopt daarbij het risico niets te vinden en dat is lastig te publiceren." Dat was voor een aantal van mijn experimenten helaas het geval. Je vindt lastiger verschillen als je geblindeerd bent of als je alles in je studie netjes randomiseert.

Laten we even teruggaan naar de vraag waarmee ik deze paragraaf begon. Heeft blinderen effect op je onderzoek? Dat is natuurlijk van het grootste belang voor de keuze om te blinderen, als er bevestigd kan worden dat de metingen van Rosenthal en Fode een reëel onderzoeksrisico vormen in dierexperimenteel onderzoek. Een antwoord op de vraag was een bijvangst van de studies die CAMARADES heeft uitgevoerd. Bij een systematisch onderzoek naar effecten van preklinische behandelingen op bijvoorbeeld een lokale beroerte, konden de onderzoekers het effect van blinderen én randomiseren in kaart brengen. Wanneer ze onderzoeken splitsten op wel of niet vermelde blinding en randomisatie, vonden zij dat de geblindeerde en gerandomiseerde onderzoeken een minder groot effect hadden van een behandeling dan degene die geen blinding en randomisatie toepasten. Een voorbeeld daarvan zie je in afbeelding 2, waarin de invloed is weergegeven van deze componenten van onderzoekskwaliteit op het effect van een nieuwe experimentele behandeling voor beroertes. In rood en oranje zijn de verschillen aangegeven die mogelijk door het blinderen en randomiseren zijn ontstaan. Dat kan twee dingen betekenen. Met geblindeerd en gerandomiseerd onderzoek vind je bepaalde effecten niet of ongeblindeerde en ongerandomiseerde studies geven bevindingen die in werkelijkheid niet bestaan. Het eerste zou blinderen en randomiseren onverstandig maken. In het tweede geval zou niet blinderen en randomiseren gevaarlijk zijn



Afbeelding 3: Effectiviteit van dierstudies voor de patiënt. In blauw het aantal potentiële behandelingen van plaatselijke beroerte. In paars het aantal studies dat in diermodellen in onderzocht. In groen het aantal interventies dat positief zou zijn in diermodellen. Hiervan zijn er 97 in de kliniek getest. Van deze behandelingen was er maar een effectief in de kliniek. Van achttien andere klinische studies betreffende behandelingen die geen traject in dierstudies hadden doorlopen, waren er drie succesvol. (Gebaseerd op data Malcolm MacLeod [6]).

voor verder onderzoek en uiteindelijk voor de patiënt, want indien we effecten systematisch overschatten, komt de patiënt in gevaar.

De risico's voor de patiënt

De patiënt is een zeer belangrijke factor in onderzoek naar medische behandelingen. Als je de vergunningen erop naslaat, is de verantwoording van bijna alle studieprojecten uitgevoerd op dieren, zeker de preklinische studies, gebaseerd op het helpen van patiënten. In de meeste gevallen zijn de patiënten mensen, die lijden aan een ziekte waar men meer van wil weten of, in het geval van preklinische studies, die men wil behandelen. De vraag is hoe goed die studies erin slagen een effectieve behandeling te vinden. Dat blijkt tegen te vallen, vooral in het geval van beroertes. Van de honderden behandelingen die in beroertemodellen effectief bleken, heeft maar één de patiënten geholpen, terwijl bijna honderd behandelingen op patiënten zijn getest (afbeelding 3). Dat betekent dat duizenden patiënten lijdend aan een beroerte – een behoorlijk heftige aandoening – belast zijn geweest met een ineffektieve experimentele behandeling. Dat moeten we echt voorkomen. Er zijn veel discussies gaande over het gebrek aan translatie (d.w.z. of de modellen wel iets zeggen over de mens). Dat zijn nuttige discussies, maar pas als zeker is dat de modellen wel iets zeggen over zichzelf. Als we door gebrek aan blinderen en randomiseren bevindingen doen die voortkomen uit onze eigen wensen, dan zijn die natuurlijk niet terug te vinden in een gerandomiseerde en geblindeerde studie in de mens. Het mag de onderzoeker een mooie publicatie opleveren, maar het levert de patiënt – waar het allemaal om te doen was – niets meer op dan een extra belasting op het herstelproces.

Iedereen kan helpen

Blinderen en randomiseren is niet moeilijk, maar vooral blinderen kun je niet makkelijk alleen doen. We moeten dus allemaal meewerken: van verzorger tot professor. Het begint met >>

ruimte en ondersteuning van onderzoekers om goed onderzoek te doen en ervoor te zorgen dat daarvoor de middelen aanwezig zijn. De kosten voor die middelen vallen in vergelijking tot vaak peperdure apparatuur en onderzoeksdieren wel mee. Daarnaast is een paar uur vrijmaken om elkaar te helpen of de hulp van een biotechnicus of dierverzorger inschakelen al snel afdoende.

Onderzoekers, werk hierin samen en help elkaar de juiste keuzes te maken. Zorg voor elkaars blinderings sleutels en bedenk een manier om ook monitoring op uitval te reguleren in lijn met je humane eindpunten. Gebruik beschikbare randomisatieprogramma's en wissel ervaringen hierover uit. Bedenk dat de kwaliteit van je onderzoek ook op deze punten steeds vaker voorwaarde wordt voor publicatie. En dat is terecht. Maar het belangrijkste argument zou moeten zijn dat je zeker wilt zijn dat je studies de waarheid onthullen, ook als dat betekent dat iets niet werkt, ten behoeve van de patiënt.

Biotechnici en dierverzorgers, jullie kunnen aanbieden om behandelingsspuitjes of preparaten te blinderen en het behandelingslabel te vervangen door een diernummer. Doe voorstellen voor het random plaatsen van dieren in kooien en – iets dat vaak wordt vergeten – het random plaatsen van de kooien in de stelling (alleen in het geval dat niet elke behandeling in een kooi vertegenwoordigd kan zijn). Als we samenwerken en dit doel voor ogen houden, dan wordt het vanzelf normaal.

Een paar praktische tips

Om geblindeerd en gerandomiseerd onderzoek zo goed mogelijk uit te voeren, volg je deze stappen:

- Label behandelingen met een diernummer, niet met behandeling A of B, om te voorkomen dat je dieren aan elkaar linkt en patronen zoekt.
- Blindeer alles, van vooraf aan de inductie van een model tot en met de finale uitwerking van de data. Dus blindeer jezelf niet enkel als je de primaire metingen verricht.
- Sluit dieren blind uit van een studie, maar laat iemand monitoren of één groep niet meer uitval heeft dan andere. Dan krijg je namelijk bias door uitval. Maak vooraf afspraken wanneer aan de bel moet worden getrokken.
- Randomiseer of gebruik een Latijns vierkant als kooien in een ruimte geplaatst moeten worden om variatie in licht en temperatuur gelijk te verdelen. Doe dit zeker als dieren per kooi een behandeling krijgen, bijvoorbeeld via het voer.
- Zorg dat bij voorkeur elke behandeling gelijkwaardig in elke kooi vertegenwoordigd is, zodat elk dier mag tellen als experimentele eenheid.
- Gebruik speciale (gratis) software om het randomiseren te vergemakkelijken (zie hieronder).

Placebo laat zien dat het kan

Dat blinderen en randomiseren de standaard kan worden om op een juiste, kwalitatieve manier een studie aan te pakken, zie je aan de manier waarop we met placebo omgaan. Toen werd ontdekt dat patiënten onder invloed van een medicijn verbetering vertoonden, ook wanneer die verbetering niet aan het medicijn was toe te schrijven omdat het bijvoorbeeld geen werkzame stof bevatte, werd aan controlepatiënten in een studie standaard een placebo-mediceijn gegeven. Dat is nu een standaard werkwijze. We hebben dit zelfs bij proefdieren strikt doorgetrokken. Bij dieren doen we dat niet vanwege het placebo-effect, want zij hebben waarschijnlijk niet door dat ze een behandeling krijgen tegen de hen aangedane ziekte, maar vanwege mogelijke effecten van de behandeling zelf op het dier. We zien nu dat bij enkele >>

afdelingen, waar de Instantie voor Dierenwelzijn toezicht houdt, het blinderen en randomiseren met dezelfde vanzelfsprekendheid wordt ingevoerd. Voor je het weet kunnen we ons niet meer voorstellen dat er studies worden gedaan waarbij de onderzoekers zichzelf zand in de ogen laten strooien door de wens als vader van de gedachte. Laten we daar allemaal voor gaan.

Random getallen lijst

Als je slechts een random lijst getallen wilt om handmatig in te delen, kun je die vinden op: <https://www.random.org/>

Gerandomiseerd dieren indelen

Voor het indelen van dieren kun je ook RandoMice gebruiken. RandoMice is een gratis tool die is ontwikkeld door onderzoekers van het Leids Universitair Medisch Centrum om dieren willekeurig te verdelen over verschillende behandel- en controlegroepen. Daarnaast kun je met deze tool nog een stap verder gaan, namelijk door groepen te creëren die goed gebalanceerd zijn voor een of meerdere variabelen, zoals lichaamsgewicht of leeftijd. Zo weet je zeker dat er geen of nauwelijks variatie tussen groepen is voor variabelen die de uitkomst kunnen beïnvloeden. Het is bijvoorbeeld niet gewenst dat alle zwaardere muizen in dezelfde groep zitten als je onderzoek doet naar een behandeling voor obesitas. Door dieren voor dergelijke variabelen zo goed als mogelijk te verdelen over groepen en de groepen vervolgens random aan een behandeling toe te wijzen, zal de uitkomst van de proef betrouwbaarder zijn en zijn er mogelijk minder dieren nodig.

RandoMice is te downloaden op: <https://github.com/RvE54/RandoMice/releases>.

Een gebruikshandleiding is te vinden op: <https://github.com/RvE54/RandoMice/blob/master/readme.md>.

Bronnen

1. Ritskes-Hoitinga M (2019). Beter bewijs met proefdierlijk onderzoek. Inaugurale rede d.d. 6 november 2019. Benaderd 17 april 2020 via: <https://www.radboudumc.nl/en/research/departments/health-evidence/systematic-review-center-for-laboratory-animal-experimentation>
2. RadboudUMC (2020). SYRCLE e-Learning Systematic Reviews. Beschikbaar via: <https://www.youtube.com/watch?v=X7hRq34Dypo&t=6s>
3. Rosenthal R, Fode KL (1963). The effect of experimenter bias on the performance of the albino rat. *Behavioral Science* 8: 183-189
4. Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies (2014) Beschikbare informatie benaderd op 11 mei 2020 via: <http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/>
5. Macleod MR, Lawson McLean A *et al.* (2015). Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. *PLoS Biology* 13(10): e1002273. doi:10.1371/journal.pbio.1002273
6. Macleod MR, Van der Worp HB, Sena ES *et al.* (2008). Evidence for the Efficacy of NXY-059 in Experimental Focal Cerebral Ischaemia Is Confounded by Study Quality. *Stroke* 39 (10): 2824-2829. doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.515957
7. Macleod MR (2009). Educational workshop "Ischemia Models". BRAIN2009 The XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism & IXth International Conference on Quantification of Brain Function with PET, June 29 - July 3, Chicago, IL, USA

Links

Dit verhaal is op een andere wijze in beeld gebracht in deze video: <https://jwp.io/s/VyYrUEja> bias. (Gemodificeerd uit MacLoad *et al.* [6]).

«