

Invloed van veel gebruikte anesthesiemiddelen op fysiologische parameters van de muis



A. Koeman¹, C.J. Zuurbier¹, M.W. Hollmann¹, W.J. Florijn²

¹Laboratorium van Experimentele Intensive Care en Anesthesiologie, Afdeling Anesthesiologie, Amsterdam. A.vangalen@amc.uva.nl

²Proefdierdeskundige, AMC-UvA, Amsterdam

Beïnvloeden anesthetica onze onderzoeken meer dan wij dachten? Voorafgaande studies in de rat hebben al gedemonstreerd dat anesthesie met ketamine-xylozine, ketamine-medetomidine-atropine (KMA) of isofluraan (ISO) een groot effect heeft op de basale glucose spiegel van de rat (1). Ook is bekend dat lokale anesthesie een belangrijke rol kan spelen in ontstekingsmechanismen. Echter, kennis over hoe in de muis verschillende anesthetica ontstekings- en stofwisselingsprocessen beïnvloeden ontbreekt. In dit en een volgend artikel vatten wij de kennis hierover samen voor twee veelgebruikte muizenstammen (C57BL/6 en FVB).

Inleiding

Tijdens mijn opleiding ben ik groot gebracht met de Hypnorm/Dormicum (Fentanyl, Fluanisone, Midazolam (FFM)) mix ten behoeve van injectie-anesthesie. We gebruikten dit in elke praktijkles en dit was dus de anesthesie die je meebracht naar je nieuwe werkvloer. Ook daar, bij kleine chirurgische ingrepen werd het potje Hypnorm uit de kast gehaald en probeerde je de nieuwe studenten uit door ze de Hypnorm te laten mixen met fysiologisch zout want ja, dan kristalliseerde de mix! Maar enige tijd geleden is Janssen Pharmaceutica gestopt met het produceren van Hypnorm. Het fabriceren van Hypnorm werd overgenomen door een bedrijf in Engeland. Enige tijd later is de productie echter in zijn geheel gestopt, waardoor vervanging door een alternatief noodzakelijk werd. Jaren geleden vergeleken wij in de Biotechniek van september 2005 voornamelijk de hemodynamische effecten (bloeddruk, hartfrequentie) van drie veelgebruikte anesthetica (waaronder dus FFM) in de muis. Wij hebben op basis van verder onderzoek een overzichtsartikel in een vaktijdschrift gepubliceerd (2), nu voldoen wij graag aan het verzoek van de Biotechniekredactie om deze informatie met de werkvloer te delen. Op dit moment vindt veel onderzoek plaats naar metabole en inflammatoire ziektebeelden, omdat vetzucht, overgewicht en chronisch ontstekingen van bijvoorbeeld de lever grote problemen »

zijn van deze tijd. Hier laten wij zien in welke mate FFM, KMA en ISO deze parameters beïnvloeden in de muis. In een vervolgartikel zullen we alternatieven gaan bekijken voor de FFM mix, en deze alternatieven vergelijken qua effect op hemodynamica, metabole en ontstekingsparameters.

Methode

Alle experimenten worden in het AMC, Amsterdam, uitgevoerd op het Laboratorium van Experimentele Intensive Care en Anesthesiologie (LEICA). Wij vergelijken twee verschillende muizen stammen met elkaar; mannelijke C57BL/6J en FVB muizen van 10-14 weken oud (Charles River, Frankrijk). Na aankomst acclimatiseren de muizen nog een week voor gebruik. We maken gebruik van de volgende anesthetica: Fentanyl (Bipharma, Hameln pharmaceuticals gmbh.), Hypnorm (VetaPharma Ltd, Uk.), Ketamine (Nimatek, Eurovet Animal Health BV, Bladel), Medetomidine, DexDormitor, (Orion Pharma, Vetoquinol BV, 's-Hertogenbosch) en Atropinesulfaat (Centrafarm, Etten-Leur).

Na inductie van de anesthesie wordt de muis om afkoeling te voorkomen onder een warmte-lamp geplaatst. Dit is essentieel omdat de lichaamstemperatuur al na 10 minuten tot 33°C daalt, wat een groot effect op hartslag (fysiologie) en ademhaling (verzuring) heeft (3). Het daarna weer op de gewenste temperatuur brengen van de muis duurt lang. Ongeveer tien minuten na de inductie reageert de muis niet meer op de tussenteenreflex (4) en wordt de halsstreek geschoren. De tussenteenreflex wordt uitgevoerd met een aangepaste vaatklep met een metalen clip, die instelbaar is met een vaste opening van 0,7mm waardoor een gestandaardiseerde

*Afbeelding 1.
Aangepaste
vaatklep met
metalen clip.*



pijn prikkel wordt gegeven (afb. 1). Er wordt een tracheotomie uitgevoerd (lengte tube 7mm, 1,0mm OD, 0,6mm ID) voor de beademing. De beademing voorkomt slechte bloedoxygenatie (zuurstofverzadiging), veroorzaakt door de effecten van de anesthesie (5). De lengte van de tube is zeer belangrijk, deze moet zo kort mogelijk zijn (=klein dood volume). Bij een te lange tube is het volume van de tube te groot ten opzichte van de longinhoud, waardoor er onvoldoende verversing van de lucht plaats vindt tijdens de beademing. Dit kan leiden tot verminderde bloedoxygenatie. Er wordt met een Minivent muizenventilator (Hugo Sachs Electronik, March-Hugestetten, Germany; percentage $O_2:N_2 = 50:50$), frequentie 120 teugen/min, eind-expiratoire overdruk (PEEP) 4cm H_2O ademhalingsvolume 0,21ml (voor muizen tussen de 20-30g), beademd. Voor de tracheotomie is gekozen omdat het een terminaal experiment is en het een makkelijke manier van intuberen is zonder druk te verliezen door lekkage bij de tube. De carotis arterie wordt gecanuleerd met een Solomon FunnelCath (0,667mm OD, 0,4mm ID) voor het meten van de gemiddelde (2x diastolisch en 1x systolisch) arteriële druk (mean arterial pres-

sure, MAP) en hartslag (HR). De canule wordt gevuld met NaCl en 25 units/ml heparine (LEO Pharma BV, Amsterdam) ter voorkoming van bloedstolling in de lijn. De hartslag en bloeddruk zijn zeer belangrijke parameters voor het vroegtijdig signaleren van pijnprikkels zonder dat het dier spierreactie toont. De temperatuur van de muis wordt gemeten door middel van een rectale temperatuur sensor en constant op 37°C gehouden door middel van een warmtelamp en warmtemat. Deze zijn nodig om te voorkomen dat de muis via boven- of onderkant plaatselijk oververhit wordt. Oververhitting van het onderlichaam merkt men overigens pas na uren op, met in ernstige gevallen plaatselijke stijfheid of necroseplekken als waarneembaar gevolg. Om verzuring en vochtverlies te voorkomen wordt een i.p. bolus van 0,8ml natriumchloride (0,9%) en 0,2ml natrium bicarbonaat (200mM) voorafgaande aan het experiment gegeven (6). Elk experiment duurt 60 minuten. Deze tijdsduur is gekozen naar aanleiding van ons vorige werk (7) waarin wij hebben aangetoond dat de fysiologische parameters zich in deze tijdsduur stabiliseren en verlenging van de tijdsduur geen verdere grote veranderingen veroorzaken op de hemodynamische parameters. Verkorten van de tijdsduur zou verandering in glucose waarden maskeren. Bloedmonsters zijn genomen voor, tijdens en na het experiment. Aan het begin van het experiment, voor toediening van de inductie van anesthesie, wordt door middel van een staartincisie een druppel bloed afgenomen. Tijdens het experiment, op tijdstippen t=0, 30 en 60 minuten wordt een druppel bloed afgenomen door middel van een hielprik. Glucose waarden in het bloed worden bepaald met een glucose strip (Freestyle Freedom glucose strips, Abbott Diabetes Care Inc, Alameda, CA, USA). Aan het einde van het experiment wordt een monster van 0,4 ml arterieel bloed genomen uit de carotis canule. Hiervan wordt 0,2 ml gebruikt voor bloedgasanalyse (RAPIDPoint 500, Siemens Healthcare Diagnostics, Breda) en de resterende 0,2 ml apart gecentrifugeerd en het verkregen plasma daarna opgeslagen in de -80°C vriezer. Het plasma wordt gebruikt voor het analyseren van IL-6, TNF- α , insuline en vrije vetzuren, verschillende metabole en ontstekingsindicatoren.

In dit artikel zal ik de drie meest gebruikte anesthetica in proefdieren bespreken (FFM, KMA en ISO). In het vervolgartikel zullen we de resultaten van een vijftal geteste alternatieven weer-geven. Tien minuten na inductie van de anesthesie wordt de diepte van de anesthesie gecontroleerd d.m.v. de tussenteenreflex. Bij een reactie van de tussenteenreflex wordt er aangenomen dat de diepte van de anesthesie niet voldoende is voor chirurgie en wordt door middel van een extra bolus anesthesie (1/4 van de inductiebolus) gezorgd dat het dier goed onder narcose is. Pas na volledige verdwijning van de tussenteenreflex wordt een arteriële lijn in de carotis geplaatst. Ontbreken van tussenteenreflex en bloeddruk en hartslag respons geven een goede indicatie voor een volledige chirurgische anesthesie. Elke twintig minuten wordt de tussenteenreflex controle herhaald. Bij een verhoging van bloeddruk of hartslag ten gevolge van de tussenteenreflex controle krijgen de dieren een onderhoudsbolus anesthesie (zie tabel) toegediend.

	FFM	KMA	KMA onderhoud	ISO
Ketamine(nimatek®)		125mg/kg	36 mg/kg	
Midazolam	12,5mg/kg			
Hypnorm	0,63mg/kg fentanyl			
	25mg/kg fluanison			
Dex-Medetomidine		0,2 mg/kg	0,08 mg/kg	
Atropine		0,5 mg/kg	0,075 mg/kg	
Induc/bolus mix	0,1ml/10g	0,075 ml/kg		4%
Onderhoud	0,025ml/10g		0,025ml/kg	1,5-2%

Het meten van de bloeddruk geeft een goede indicatie van de gesteldheid van het dier. Net als bij de mens wil je voorkomen dat de bloeddruk veel lager zakt dan 60 mm Hg, want dan treedt er ischemie (ernstig zuurstofgebrek) op in bepaalde delen van het dier. Deze ischemie kan de »

Tecnilab- BMI

info@tecnilab-bmi.nl . +31(0)493-440706 . www.tecnilab-bmi.nl

Service Support Supply Solutions



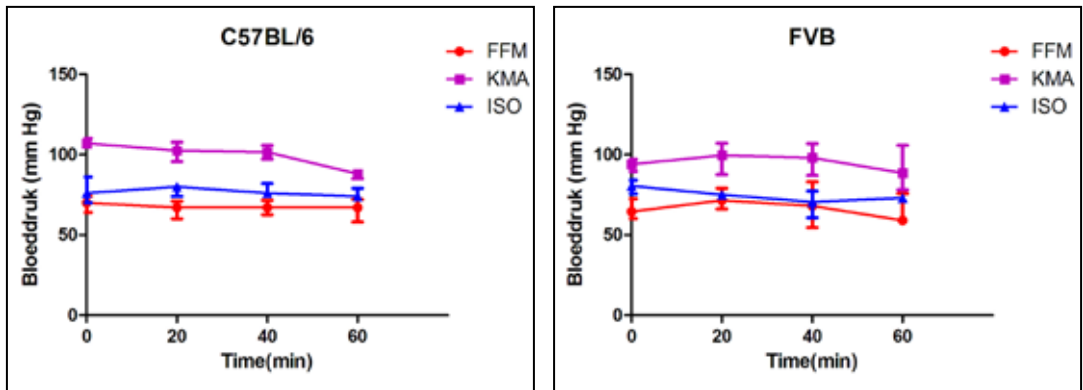
Caging &
Washing Equipment

Disinfection
systems

Diets &
Special Diets

Bedding &
Enrichment

Veterinary
Products



Afbeelding 2a, b. Bloeddruk van C57BL/6 muizen (links) en FVB muizen (rechts).

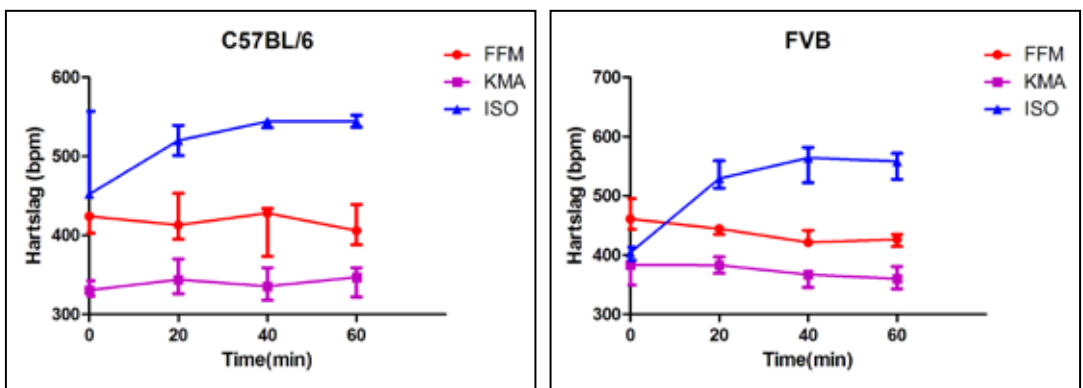
metingen verstoren die je gaat uitvoeren op het dier. Controle muizen (bloedafname zonder anesthesie) worden gedood door middel van cervicale dislocatie, waarna middels een hartpunctie bloed wordt afgenomen.

Resultaten

Bloeddruk en hartslag

Als eerste vergeleken we de bloeddrukken van de muizen (afb. 2a, b). Daarbij vergeleken we de verschillende anesthetica maar ook verschillende muizenstammen met elkaar. De muizen bereikten allemaal chirurgische diepte: Geen pijnreactie op de tussenteenreflexcontrole en geen verhoging in hartslag bij deze controle. De hoogste waarden in de MAP (~90-100mm Hg) vonden we in de KMA mix bij zowel de FVB als de C57BL/6. ISO en FFM veroorzaakten een gelijkwaardige MAP (~70-80 mm Hg) in beide stammen.

De hoogste HR (~500-550 bpm) werd gevonden in beide stammen met ISO (afb. 3a, b). De KMA mix die de hoogste bloeddruk aangaf, heeft in contrast de laagste HR (~350bpm) in beide stammen. Deze lage hartfrequentie is te wijden aan het gebruik van (dex)medetomidine. Door het toevoegen van atropine konden we de hartslag boven onze minimale grens (>300 bpm) houden. De FFM mix gaf een gemiddelde HR van 400-480 bpm. Voor de niet verdoofde muis zijn de bloeddrukken rond de 100 mm Hg en een hartslag rond de 500-600 bpm normaal. De waarden in elke verdoofde muis zijn iets lager. Dit is onoverkomelijk bij het gebruik van elke



Afbeelding 3a, b. Hartslag van C57BL/6 muizen (links) en FVB muizen (rechts).

»

UNO Rodent Cages



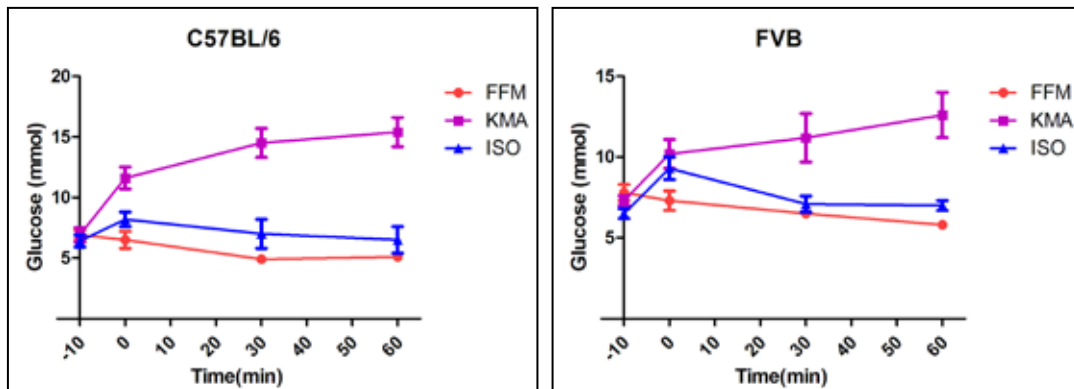
- * Plastic cages in various types and sizes.
- * Cages available in polycarbonate and polysulphone.
- * Various models of matching wire lids available.
- * Filtertops available for type II, type III and type IVS.



UNO Roestvaststaal BV

PO Box 15 - 6900 AA Zevenaar - The Netherlands

Phone: +31 316 524451 Fax nr.: +31 316 523785 Email: info@unobv.com



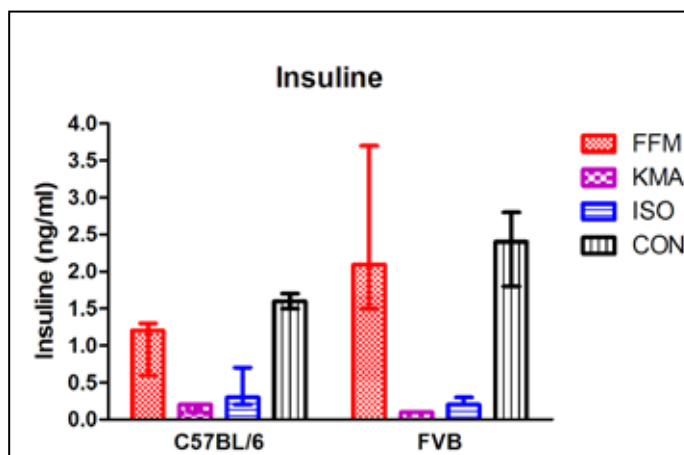
Afbeelding 4a, b: Glucose van C57BL/6 muizen (links) en FVB muizen (rechts)

verdooving. Concluderend geeft de KMA mix de hoogste bloeddrukken, maar dit gaat gepaard met een lagere hartfrequentie. Meer in het algemeen blijkt dat de drie anesthetica aanvaardbare (> 300 bpm hartslag en > 60 mm Hg bloeddruk) hemodynamische parameters geven.

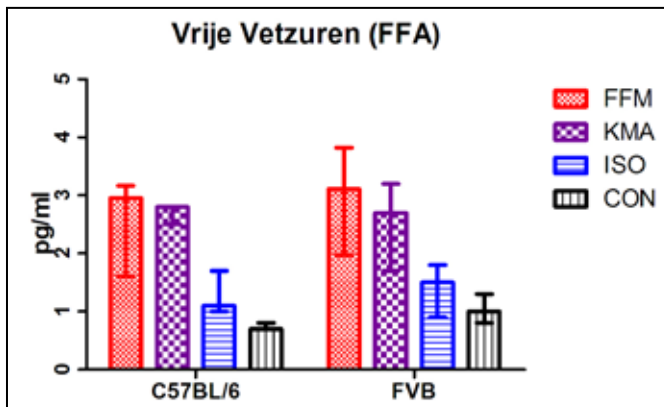
Metabole parameters

De glucosespiegel is gedurende het experiment gemeten (afb. 4a, b). De dieren waren niet gevast en begonnen met een glucosespiegel van 6,2-7,4 mM als normaalwaarde gemeten voor inductie van de anesthesie. Gelijk na inductie met KMA steeg de bloedglucosespiegel tot hyperglycemische hoogte. Gedurende het KMA-experiment bleef de bloedglucosespiegel stijgen in beide stammen. ISO gaf een tijdelijke, slechts geringe verhoging na inductie van de anesthesie in tegenstelling tot de FFM die bij de FVB muis zelfs tot een kleine daling in bloedglucose-spiegel leidde. Een half uur na inductie van de anesthesie van ISO waren de waarden weer terug naar basaal. Aan het einde van het experiment is bloed afgenomen waarin we ook insuline afgifte hebben gemeten (afb. 5).

KMA en ISO verlaagden de insuline spiegel ten opzichte van de niet-verdoofde muis significant; FFM had geen effect op insuline. De zeer lage insulinespiegels ten gevolge van de KMA mix dragen zeer waarschijnlijk bij aan de hoge bloedsuikerspiegels tijdens het experiment die werden waargenomen bij het gebruik van deze mix. Dat de iets hogere insulinespiegels met ISO geen blijvende hyperglycemie geven, komt waarschijnlijk omdat medetomidine in de KMA mix



Afbeelding 5. Insuline van C57BL/6 muizen (links) en FVB muizen (rechts) »



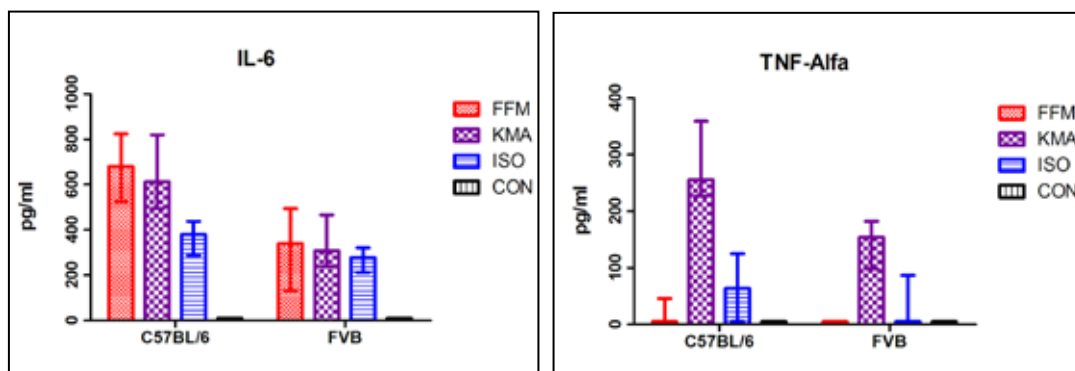
Afbeelding 6.
Vrije vetzuren van
C57BL/6 muizen (links)
en FVB muizen (rechts)

ook de glucagonspiegels omhoog brengt (8), terwijl ISO dit niet doet. Glucagon verhoogt de glucoseproductie van de lever, terwijl insuline zorg draagt dat weefsel glucose gaat opnemen.

Vetzuren worden uit het vetweefsel vrijgemaakt als het lichaam energie nodig heeft. Bijna alle cellen (hersencellen en erythrocyten uitgezonderd) kunnen vetzuren verbranden om in hun energiebehoefte te kunnen voorzien. Het is voor vele organen en weefsels het belangrijkste energiestruaat. Vrije vetzuren komen in lage hoeveelheid voor in het bloed en zijn bovendien gebonden aan het bloedeiwit albumine. Een verhoogde afbraak van vetzuren vindt plaats bij diabetes en zorgt dus ook voor een verhoging van vrije vetzuren in het bloed. De hoeveelheid vrije vetzuren daalt wanneer de suikerstofwisseling zich normaliseert, dus bijvoorbeeld na een optimaal ingestelde insuline behandeling bij een patiënt met suikerziekte. ISO heeft bij beide stammen geen effect op de vrije vetzuurspiegel, wat contrasteert met de insuline en glucose waarden (afb. 6). Het vrije vetzuur gehalte bij de andere twee anesthetica is in beide stammen significant verhoogd. Wel moet worden aangemerkt dat de gemeten vetzuurspiegel hoog is. Normaal is deze tussen de 0,3-0,8mM. In ons experiment zijn deze waarden verhoogd omdat we heparine in ons afgenomen bloed hebben. Het is bekend dat heparine in het bloed lipoproteïne lipase (LPL) vrijmaakt uit de vaatwand. Als dit LPL dan in de bloedbuis terecht komt breekt het heel snel de vetten af in de lipoproteïne deeltjes van het bloed, waardoor de vrije vetzuurconcentraties opeens sterk verhoogd worden.

Ontstekingsparameters

Tenslotte onderzochten we het effect van anesthesie op de ontstekingsparameters IL-6 en



Afbeelding 7a, b. Ontstekingsfactoren in het bloed: IL-6 (links) en TNF- α (rechts)

TNF- α (afb. 7a, b). Beiden zijn cytokinen, betrokken bij zowel pro- als anti-inflammatoire reacties. T-cellen en macrofagen produceren IL-6 om het immuunsysteem te stimuleren bij weefselschade. IL-6 speelt een rol in een aantal ziekten, waaronder diabetes. Diverse onderzoeken tonen aan dat een kleine chirurgische ingreep al een effect heeft op de parameters IL-6 en TNF- α . Bij de niet-geanestheerde en niet-geopereerde muis waren de uitslagen bij beide cytokines onder de detectiewaarde. Bedenk hierbij dat alleen al de tracheotomie en de vaatcanulatie weefseltrauma veroorzaakt en dus effect heeft op ontstekingsparameters. Op de eerste plaats is duidelijk dat de C57BL/6 muis een verhoogde staat van ontstekingsreactie heeft in vergelijking met de FVB muis. Ten tweede wordt duidelijk dat ISO de laagste ontstekingsreactie veroorzaakt; dit is bekend, ISO wordt soms wel gezien als anti-inflammatoir. Tenslotte wordt duidelijk dat KMA juist een verhoogde ontstekingsreactie geeft, zeker voor de pro-inflammatoire cytokine TNF- α .

Discussie

Analyse van de resultaten maakt duidelijk dat elk type anesthesie zo zijn vóór- en nadelen heeft. Natuurlijk moeten wij wel kijken naar de vraagstelling van ons experiment en ervoor zorgen dat de anesthesie niet onze uitleesparameters beïnvloedt. ISO en FFM kunnen goed gebruikt worden in studies naar ontstekingsreacties, maar bij KMA noopt het krachtige effect op TNF tot voorzichtigheid. KMA zou hier onze voorkeur niet hebben, zeker zouden we nagaan of de grootte en richting van een behandelingseffect fundamenteel anders wordt door KMA versus andere anesthetica. Voor hemodynamische studies zijn alle drie de mixen bruikbaar. KMA is ten eerste af te raden bij metabole studies, vooral bij vraagstellingen waar glucose en insuline in betrokken zijn. De verhoging van de glucose waarden en verlaagde insuline waarden in de met KMA mix geanestheerde muizen, is te wijten aan de α -2 agonist medetomidine en niet aan de ketamine (2). Dit zullen we in het vervolgartikel laten zien. Veranderingen in de metabole en inflammatoire parameters zijn onoverkomelijk bij het gebruik van anesthesie, maar door ons te verdiepen in de werking van deze stoffen kunnen we zorgen dat de gebruikte anesthesie onze meetwaarden in de experimenten niet in hoge mate beïnvloedt.

Referenties

- 1 Zuurbier CJ *et al.* (2008). *Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats*. *Anesthesia & Analgesia* 106: 135-142
- 2 Zuurbier CJ *et al.* (2014). *Optimizing anesthetic regimen for surgery in mice through minimization of hemodynamic, metabolic, and inflammatory perturbations*. *Experimental Biology and Medicine* 239: 737-746
- 3 Adam C Caro *et al.* (2013). *Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL/6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 52(5): 577-583
- 4 Flecknell P (2009). *Anaesthetic management*. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3rd edn. San Diego, CA: Academic Press, 81-82
- 5 Schwarte LA *et al.* (2009). *Mechanical ventilation of mice*. *Basic Research in Cardiology* 95: 510-520
- 6 Wolthuis EK *et al.* (2009). *Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice*. *Critical Care* 13: R1
- 7 Zuurbier CJ *et al.* (2002). *Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support and strain*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282: H2099-2105
- 8 Angel I *et al.* (1990). *Involvement of alpha-2 adrenergic receptor subtypes in hyperglycemia*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 254:877-882

«