

Stressvrije bloedafname door een incisie in de staartvene van de rat

Marc Fluttert

Universiteit Leiden, Faculteit der Wiskunde & Natuurwetenschappen, fluttert@science.leidenuniv.nl

Tijdens de Biotechnische Dagen in 2001 heb ik een presentatie gegeven over bloedafname via de staartvene bij de rat. Ik zou nog altijd een artikel aanleveren voor Biotechniek en in 2006 werd ik door één van de coördinatoren herinnerd aan deze toezegging. Onder het motto 'beter laat dan nooit' heb ik beloofd deze toezegging dit jaar nog te realiseren. Hieronder het resultaat.

Aanleiding

Ik werkte als zoölogisch analist bij de onderzoeksgroep LACDR/Medische Farmacologie van de Universiteit Leiden. Er was behoefte aan een techniek om herhaald bloed af te nemen bij de rat waarbij de stresshormonen (ACTH en corticosteron) konden worden gemeten tijdens gedragstudies. Bloedafname onder anesthesie was dus geen optie. Ook moest de techniek geschikt zijn voor een lange termijn studie bij de rat. De techniek van cannulatie kwam niet in aanmerking door de duur van het gehele experiment, 33 maanden. Zo kwamen we uit op bloedafname via de staartvene.

Diverse varianten van deze techniek werden overal toegepast. Literatuuronderzoek wees uit dat de techniek, zoals ik deze uitvoerde, nog niet beschreven was in een artikel. Dus kwam de vraag of ik de techniek wilde opschrijven in een artikel, handig voor literatuurverwijzing bij wetenschappelijke artikelen. Mijn eerste reactie was: wat moet je opschrijven? Dat je een sneetje maakt in de staart van een rat!? Zijn de bloedwaarden, afgenomen door de verschillende technieken, vergelijkbaar? Kun je basaalwaarden en stresswaarden meten met de staartvene techniek? Heeft de techniek zelf invloed op de stresshormonen? Allemaal vragen die opkamen.



Van het één komt het ander en voor je 't weet heb je genoeg resultaten voor een artikel.

materiaal en methode

Procedure

Voor bloedafname via de staartvene worden ratten van minimaal 200 gram gebruikt. Maximale afname per rat is 2,5 ml (in ons experiment $7 \times 300 \mu\text{l}$). Daarna krijgt de rat subcutaan fysiologisch zout en zeven dagen rust om de concentraties van bloedcellen en -eiwitten weer op peil te brengen.

De techniek kan het meest optimaal worden uitgevoerd door twee medewerkers. Medewerker 1 haalt de rat uit de kooi, houdt de rat op de plaats en plaatst de rat weer terug. Medewerker 2 zet het sneetje in de staart en verzamelt het bloed. Vooraf moet de rat gedurende enige tijd 'gehandeld' en gewogen worden door beide medewerkers. De rat went aan de onderzoeker en de gewichtstoename (en gezondheid van de rat) kan worden gecontroleerd.



Afbeelding 1 a

De rat wordt op positie gehouden.
De rat zoekt een comfortabel holletje in de theedoek.



Afbeelding 1 b

Het fixeren van de staart en het voorzichtig maken van de incisie.



Afbeelding 1 c

Het 'melken' van de staart waardoor een bloeddruppel ontstaat.
Let op de positie van de linkerhand.

Op dag van de bloedafname is nodig:

een tafel, een stoel, een handdoek, een scheermesje, een cupje om het bloed op te vangen (Microvette 300, EDTA-coating, Sarstedt) en een bak ijs voor koeling van het monster. De handdoek wordt twee keer dubbel geslagen met de punten naar elkaar toe om een holletje voor de rat te creëren. De rat wordt rustig op de handdoek geplaatst en door medewerker 1 op de plaats gehouden. Niet stevig vastpakken of het dier geforceerd op de plaats houden. Dit geeft stress bij het dier (Afb. 1a). Medewerker 2 maakt rustig met een nieuw scherp mesje diagonaal ongeveer 1,5 cm van de punt van de staart een diagonaal sneetje. Let op, de huid is stug en taai maar daarna ga je als een mes door de boter. Dus rustig in het begin even met iets druk snijden en als je voelt dat je door de huid gaat meteen ophouden. De dorsale vene wordt doorgesneden. Met de vrije hand houd je de staart tijdens het maken van de snede op de plaats (Afb. 1b).

Nu het sneetje is gezet ontstaat er een druppel bloed. Je stimuleert de bloedstroom door rustig met de wijsvinger, middelvinger en duim vanaf de basis van de staart naar het sneetje te gaan. Kijk daarbij op de toppen van de drie vingers (zie afbeelding). Deze stand is erg belangrijk. Alleen bij de laatste 2 cm mag je iets druk geven. De bloeddruppels die verschijnen, worden opgevangen in het cupje. Deze handeling wordt herhaald tot dat het cupje gevuld is. Maximale tijd is 90 seconden om de kwaliteit van het

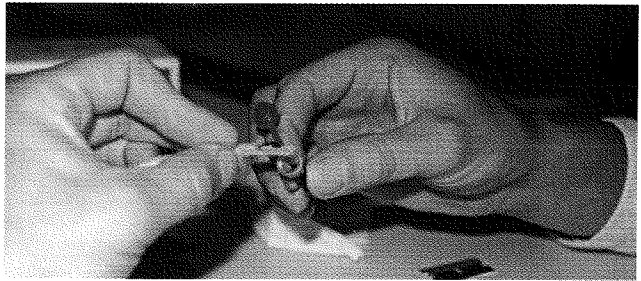
bloed tussen de monsters gelijk te houden. Geen druk uitoefenen tijdens het stimuleren, want dat is pijnlijk voor het dier en induceert vasoconstrictie; dus het bloed niet eruit persen!! Na afname stopt het bloeden vanzelf.

Als tijdens de afname het bloed over het topje van de staart gaat vloeien, worden geen drup-

pels meer gevormd en wordt verzamelen lastig. De staart met een tissue droogmaken en er ontstaan weer druppels. De procedure kan weer worden voortgezet.

Bij nieuwe bloedafname kan het wondje simpel worden opengemaakt met een tissue.

Het wordt moeilijker wanneer tussen twee monsters een langere tijd zit dan 20 minuten. Het is dan beter om met een nat gaasje het korstje op de wond voorzichtig te openen (maakt het korstje een beetje week). Altijd eindigen met een tissue om de tip van de staart droog te maken. Bij bloedafname tussen de verschillende dagen of maanden moet een nieuw sneetje worden gemaakt richting staartbasis, enkele millimeters boven het laatste sneetje.



Afbeelding 1 d

Het verzamelen van de bloeddruppels met een EDTA-gecoat buisje.

Dieren en experiment

Het experiment staat al beschreven in *Laboratory Animals* (1). Het doel van het experiment is om het effect van bloedafname via de *vena jugularis* of via een staartsnede op corticosteronconcentraties in het bloed met elkaar te vergelijken. Het zijn eigenlijk twee experimenten. Hieronder volgt een korte beschrijving.

In het eerste experiment wordt bij de ratten verschillende concentraties corticosteron subcutaan ingespoten. Vervolgens wordt na 60 minuten bloed afgenomen via de *vena jugularis* (verblijfsnede) of via een staartvene met behulp van een staartsnede.

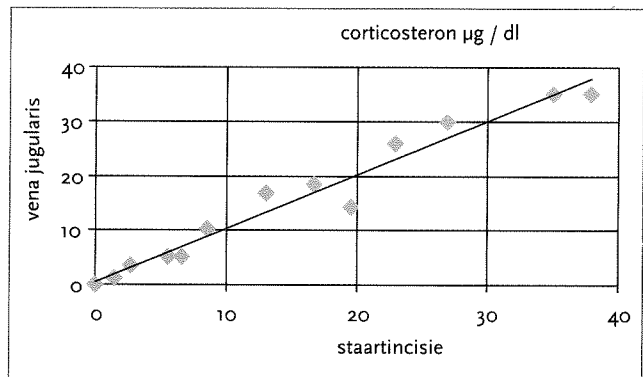
Bij het tweede experiment wordt gekeken of de staartsnedetechniek invloed heeft op de stresshormoonspiegel (corticosteron) in het bloed. Er wordt een bloedmonster genomen op tijdstip $t = -60$ minuten (nulwaarde). Vervolgens wordt de ene helft van de groep op tijdstip $t = 0$ in een nieuwe kooi geplaatst (stressor) en de andere helft van de groep in hun thuishok (blanco). Daarna wordt op verschillende tijdstippen ($t = 20, 40, 60, 90, 120$ en 180 min na plaatsing in nieuwe kooi) bloed afgenomen met behulp van de staartsnede techniek zoals eerder beschreven. (Afb. 1c en d)

Van alle bloedmonsters worden de corticosteronwaarden gemeten met behulp van een Radio Immuno Assay (RIA).

Resultaten

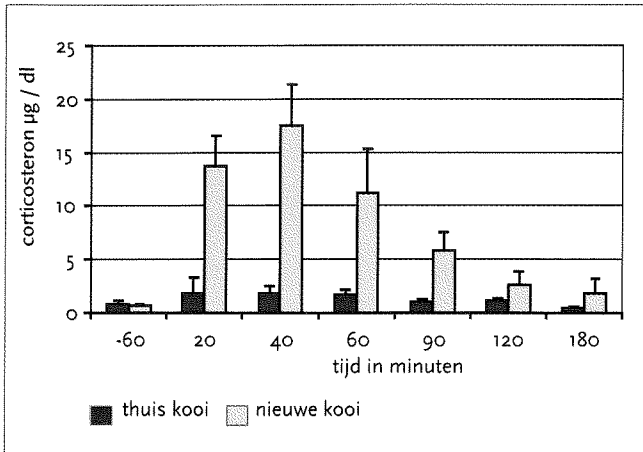
De resultaten van het eerste experiment laten geen significante verschillen zien tussen de corticosteron bloedspiegels verkregen via de verschillende technieken: correlatiecoëfficiënt $r = 0.987$ (Afb. 2).

De resultaten van het tweede experiment laten zien (Afb. 3) dat er goede verschillen te meten zijn tussen de stressgroep en



Afbeelding 2

Lineaire regressie van concentraties corticosteron in bloed, verkregen via twee verschillende bloedafnametechnieken.



Afbeelding 3. Een nieuwe kooi (stressor) induceert toenames van corticosteron concentratie in het bloed van de rat. Deze bloedwaarden zijn afgenomen d.m.v. staartincisie.

de blanco-groep. De dieren in de blanco-groep geven een lichte verhoging te zien binnen de range van normaalwaarden. De stressgroep laat een flinke verhoging zien van ongeveer acht à tien keer hogere concentraties corticosteron met een piek op t=40 minuten. Na t=90 minuten zakt deze waarde weer naar normale waarden. Concentraties glucose, respectievelijk hematocrietwaarden, in bloedmonsters verkregen via de staartsnede laten normale waarden zien (7 mmol/L, resp. 47%).

Conclusies en discussie

De staartvenetechniek geeft de mogelijkheid om zonder anesthesie bloedafname mogelijk te maken bij de rat. De techniek geeft daardoor veel minder ongerief bij de dieren in vergelijking met andere bloedafname technieken zoals orbitapunctie (met anesthesie) of de vena jugularis-canulatie (met operatietrauma). Uitval van dieren is bij de staartvene techniek niet van toepassing. Na de afname genezen de wondjes zonder infectie of afsterving. De techniek geeft geen noemenswaardige verhoging van het stresshormoon en de dieren gedragen zich rustig. Voorwaarde is wel dat de dieren vooraf zijn 'gehandeld' (en daardoor vertrouwd met de mensen die de afname doen). De staartvenetechniek is gemakkelijk aan te leren en geeft na enige oefening goede constante resultaten. Kortom, het is een goede techniek voor afname van kleine hoeveelheden bloed op bepaalde tijdstippen bij de rat. De methode geeft minimaal ongerief bij het dier. Daarbij is de totale tijdsbelasting van de experimentator vergelijkbaar ten opzichte van andere technieken of zelfs minder.

Met speciale dank aan prof.dr Melly Oitzl voor de motivatie en hulp bij het publiceren van deze techniek in *Laboratory Animals*.

Literatuur

- Fluttert, M., Dalm, S., Oitzl, M.S. (2000), *A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats*. *Lab Anim.* 2000 Oct;34(4):372-8

**Stressvrije bloedafname door een
incisie in de staartvene
van de rat**