

Verantwoorde alternatieven voor de standaard anesthesiemixen

A. Koeman¹, D. Bakker¹, C.J. Zuurbier¹, M.W. Hollmann¹, W.J. Florijn²

1 Laboratorium van Experimentele Intensive Care en Anesthesiologie, Afdeling Anesthesiologie, Amsterdam. diane.bakker@amc.uva.nl 2 Proefdierdeskundige, AMC, Amsterdam

Uit ons eerdere artikel in Biotechniek (1) blijkt dat de effecten van drie veelgebruikte anesthetica Fentanyl-Fluanisone-Midazolom (FFM), Ketamine-Midazolam-Acepromazine (KMA), Isofluraan op diverse meetparameters aanzienlijk zijn. Soms worden deze invloeden door onderzoekers genegeerd of niet onderkend, maar ze beïnvloeden wel het eindresultaat. Als beste getest is FFM (Hypnorm-Dormicum), maar Hypnorm, (Fentanyl-Fluanisone) is duur en lastig verkrijgbaar. Daarom zijn we op zoek gegaan naar alternatieve anesthesiecombinaties voor FFM, met mogelijk minder effect op diverse fysiologische meetparameters. Daarbij hebben we een voorkeur gehad voor klinisch georiënteerde anesthesiecombinaties, om extrapolatie van de data naar de humane situatie te vergroten.

Eerste uitdaging was het vinden van betrouwbare doseringen die zorgen voor een chirurgische anesthesie gecombineerd met een acceptabele fysiologie. Op basis van de literatuur en ervaring hebben wij voor de volgende combinatie van middelen gekozen: Fentanyl-Ketamine-Midazolam (FKM), Fentanyl-Midazolam-Haldol (FMH), Pentobarbital Natrium (Euthasol, EUT), Propofol-Fentanyl-Midazolam (PFM) en Fentanyl-Midazolam-Acepromazine (FMA).

Materialen

Alle experimenten zijn in het AMC te Amsterdam uitgevoerd op het Laboratorium van Experimentele Intensive Care en Anesthesiologie (LEICA). Net als eerder (1) zijn twee veelgebruikte muizenstammen met elkaar vergeleken: C57BL/6J en FVB mannetjes (n=6 per groep) van Charles River, Chatillon-sur-Chalaronnen, France). De volgende anesthetica zijn gebruikt: Fentanyl (Bipharma, Hamelen pharmaceuticals gmbh., Hamelen, Duitsland), Ketamine (Anesketin, Eurovet AnimalHealth BV, Bladel), Midazolam (Actavis, Actavis group PTC en, Hafnarfjordur, IJsland), Acepromazine (Vetranquil, Ceva Sante Animale, Naaldwijk), Haldol (Haloperidol, Janssen-Cilag, Tilburg), Euthasol (pentobarbitalnatrium, AST Farma, Oudewater) en Propofol (Lipuro, B Braun, Melsungen, Duitsland).

»

Methode voor de bepaling van de effectieve dosis

Uitgangspunt is de dosering geweest die beschreven staat in diverse artikelen. Wanneer die dosis niet de gewenste diepte van anesthesie gaf (terugtrekreflex en/of stijging in de hartslag/bloeddruk blijft aanwezig) werd de mix aan de behoefte aangepast. Dit is uitgezocht in vooronderzoek met pilotmuizen. Een uitgebreide beschrijving van de biotechnische aanpak is te vinden in ons eerdere artikel(1). Kort samengevat: de muis wordt na inductie op een temperatuur van 37°C gehouden. Er wordt een tracheotomie uitgevoerd voor de beademing. De carotis arterie wordt gecanuleerd voor het meten van de gemiddelde arteriële druk (MAP, Mean Arterial Pressure, red.) en hartslag (HR, Heart Rythm, red.). Om verzuring en vochtverlies te voorkomen wordt een i.p. bolus van 0.8 ml Natriumchloride (0.9%) en 0.2ml Natriumbicarbonaat (200mM) voorafgaande aan het experiment gegeven. Verzuring wordt daarnaast beperkt door de beademing. Elk experiment duurt 60 minuten. Aan het einde van het experiment wordt van de verdoofde dieren 0.2 ml bloed verkregen via de carotis arterie voor bloedgasanalyse en bloed voor 0.2 ml plasma voor metabole- en inflammatiebepalingen. In de onbehandelde dieren (controlegroep zonder anesthesie) worden basale plasmaspiegels verkregen via hartpunctie na cervicale dislocatie.

Resultaten

Doseringen

Per mix hebben wij aan de hand van bloeddruk en hartslag de optimale dosis uitgezocht (tabel 1). Criterium is geweest dat het dier rustig onder narcose gaat en dan binnen 10-15 minuten het chirurgisch stadium (geen respons op tussenteenreflex) is bereikt. De bloeddruk en hartslag moeten een fysiologisch acceptabel niveau hebben (> 60 mm Hg voor bloeddruk en > 300 slagen/min voor de hartslag). Onderhoudsdoseringen zijn intraperitoneaal gegeven.

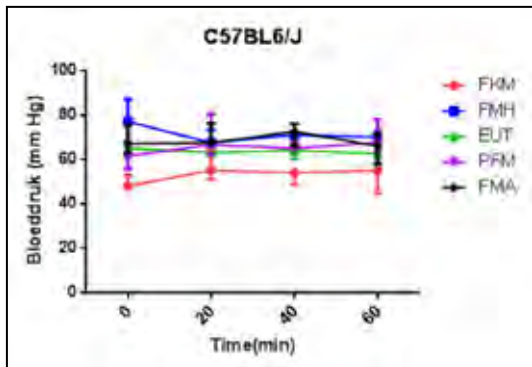
Bloeddruk en hartslag

Bij een muis zonder anesthesie is een gemiddelde bloeddruk (MAP) rond de 100 mm Hg en hartslag (HR) rond de 500-600 beats per minute (bpm) normaal. Als eerste is voor beide muizenstammen de bloeddruk tijdens de verschillende anesthesiemethoden ten opzichte van elkaar vergeleken. Bij de meeste mixen is een chirurgische anesthesiediepte verkregen, gedefinieerd als het ontbreken van een tussenteenreflex en niet optreden van een plotse verhoging in hartslag als gevolg van de reflextest (elke 10 minuten uitgevoerd). Bij de C57BL/6J muis geven FMA, PFM, EUT en FMH een gelijkwaardige MAP (~65-75mmHg) (afb. 1a). Bij de FVB muis is het niet mogelijk om met PFM een chirurgische diepte van anesthesie

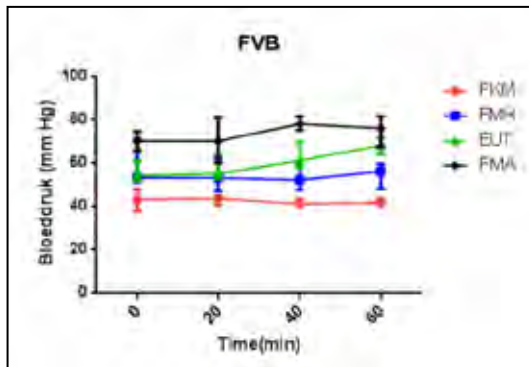
	FKM	FMH	PFM	PFM(onderhoud)	FMA	EUT
Fentanyl	0,1 mg/kg	0,65 mg/kg	1,2 mg/kg	1,6 mg/kg/hr	0,47 mg/kg	
Ketamine	100 mg/kg					
Midazolam	10 mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg		9,38 mg/kg	
Haldol		12,5 mg/kg				
Propofol				35 mg/kg	90 mg/kg/hr	
Acepromazine						9,38 mg/kg
Euthasol (pentobarbital)						80mg/kg
inductie/bolus						
mix	0,15ml/10g	0,2ml/10gr	0,315ml/10g		0,22ml/10g	0,10ml/10gr
onderhoud	25%induc/15min	25%induc/15min		continue	25%induc/20min	20%induc/20min

Tabel 1: Optimale dosis anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium)

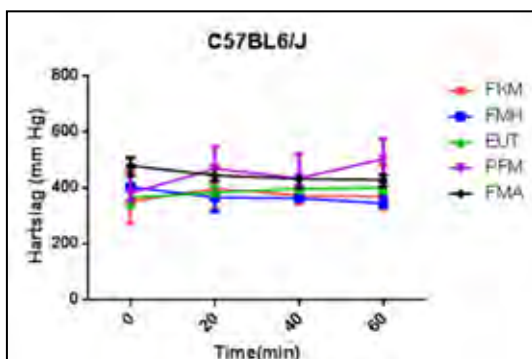
>>



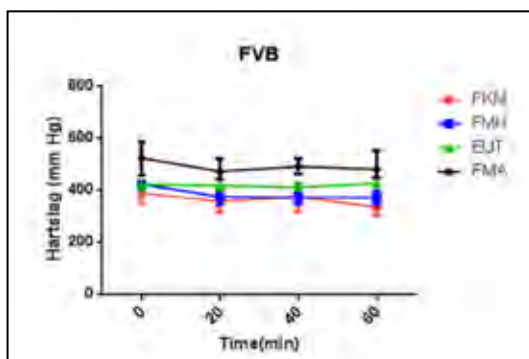
Afbeelding 1a: Bloeddruk gemeten op t = 0, 20, 40 en 60 min in geventileerde, geanestheseerde muizen bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).



Afbeelding 1b: Bloeddruk gemeten op t = 0, 20, 40 en 60 min in geventileerde, geanestheseerde muizen bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium). Bij de FVB muis was het niet mogelijk om met PFM een chirurgische diepte van anesthesie te krijgen, hierdoor kan deze anesthesie in de FVB niet verder worden gevolgd.



Afbeelding 2a: Hartslag gemeten op t = 0, 20, 40 en 60 min in geventileerde, geanestheseerde muizen bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).



Afbeelding 2b: Hartslag gemeten op t = 0, 20, 40 en 60 min in geventileerde, geanestheseerde muizen bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium). Bij de FVB muis was het niet mogelijk om met PFM een chirurgische diepte van anesthesie te krijgen, hierdoor kan deze anesthesie in de FVB niet verder worden gevolgd.

te krijgen, hierdoor is deze anesthesie in de FVB niet verder gevolgd. FMA geeft in de FVB muis de hoogste MAP (~70mm Hg) (afb. 1b). De laagste MAP (~45-55mm Hg) is in beide stammen voor de FKM gevonden.

Voor de C57BL/6 muis blijken PFM en FMA het meest geschikt om de HR op peil te houden (450-500 bpm), terwijl FKM, FMH en EUT lagere HR induceren (350-400 bpm) (afb. 2a). FMA geeft in de FVB muis naast de hoogste MAP ook de hoogste HR (~ 500 bpm) (afb. 2b), deze bloeddruk en hartslag benaderen de situatie in een wakker dier. In hemodynamische studies heeft FMA voor de FVB muis de voorkeur (ongeveer gelijk aan FFM, terwijl KMA hogere waarden laat zien (1)).

>>

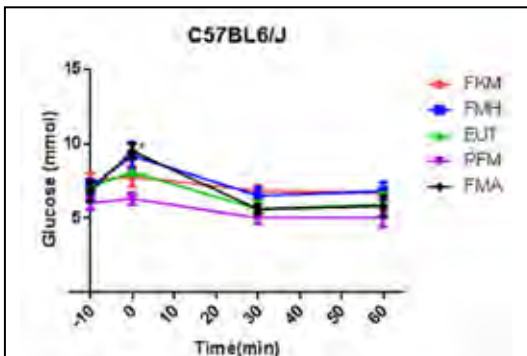
Metabole parameters

De dieren waren niet gevestigd en hadden, voor toediening anesthesie een basale glucosespiegel tussen de 6.2-7.4 mM (afb. 3a en b). Gelijk na toediening van een anestheticum stegen alle bloedglucosespiegels ten opzichte van de startwaarden. De stijging was het grootst voor FMA, zeker in de FVB muis. Gedurende het experiment namen de bloedglucosespiegels weer af. PFM in de C57BL/6 muis en EUT in de FVB muis hebben weinig tot geen effect op de bloedglucosespiegel. Een half uur na inductie van de anesthesie normaliseerden de waarden. Aan het einde van het experiment is bloed afgenomen waarin ook de insulinespiegel werd gemeten. Bij de C57BL/6 muis was de insulinespiegel alleen bij de FMA anesthesie significant verlaagd, bij de FVB muis was de insulinespiegel alleen bij de FMH-mix significant verlaagd (afb. 4).

Het vrije vetzuur (FFA)-gehalte was in de C57BL/6 muis bij bijna alle anesthetica significant verhoogd, met uitzondering van de FKM, terwijl het FFA-gehalte in de FVB muis alleen significant verhoogd is bij EUT en FMA (afb. 5).

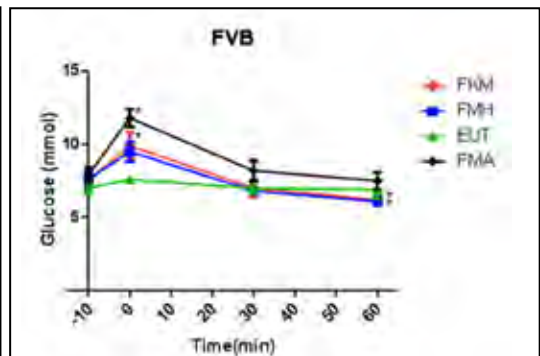
Ontstekingsparameters

Ten slotte onderzochten we het effect van anesthesie op de ontstekingsparameters IL-6 en TNF- α . Beide zijn cytokinen, betrokken bij zowel pro- als anti-inflammatoire reacties. T-cellen en macrofagen produceren IL-6 om het immuunsysteem te stimuleren bij weefsel schade. Diverse onderzoeken hebben aangetoond 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 (afb. 6 en 7). Bedenk hierbij dat alleen al de bij alle muizen uitgevoerde tracheotomie en de vaatcanulatie weefseltrauma veroorzaakt en IL-6 en TNF α verhoogt. In de eerste plaats blijkt dat de ontstekingsparameter IL-6 bij de meeste anesthetica verhoogd is in de C57BL/6 muis in vergelijking met de FVB muis. Daarnaast blijkt de FKM voor beide stammen hoge cytokinespiegels te bewerkstelligen. EUT en FMA induceren de minste verhoging van IL-6 en TNF α in de FVB muis, maar een verhoging van beide cytokines in de C57BL/6 muis.



Afbeelding 3a: Bloedglucoselevels gemeten voor anesthesie (-10) en op t = 0, 30 en 60 min in geventileerde, geanestheerde muizen bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium)

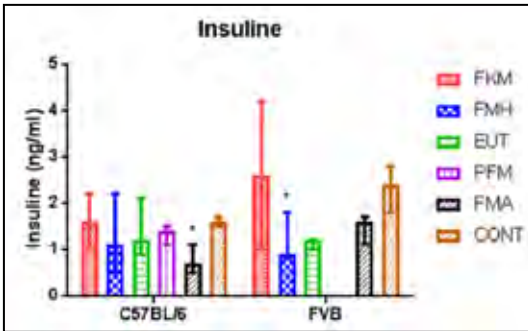
* $P < 0,05$ ten opzichte van de bloedglucosewaarde voor de anesthesie.



Afbeelding 3b: Bloedglucoselevels gemeten voor anesthesie (-10) en op t = 0, 30 en 60 min in geventileerde, geanestheerde muizen bij verschillende anesthesiemixen;

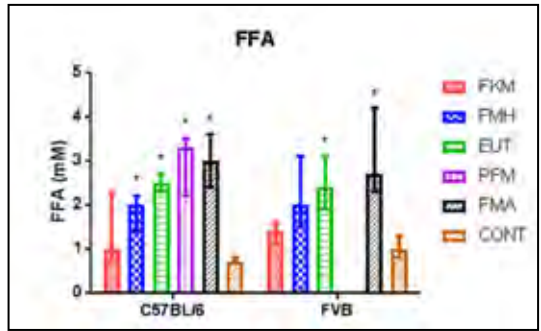
FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium). Bij de FVB muis was het niet mogelijk om met PFM een chirurgische diepte van anesthesie te krijgen, hierdoor kan deze anesthesie in de FVB niet verder worden gevolgd.

* $P < 0,05$ ten opzichte van de bloedglucosewaarde voor de anesthesie.



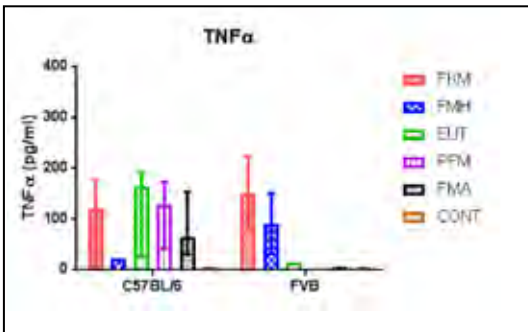
Afbeelding 4: Insulinespiegel gemeten in het plasma aan het eind van het experiment bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).

*P < 0,05 vergeleken met de controle van de specifieke muizenstam.



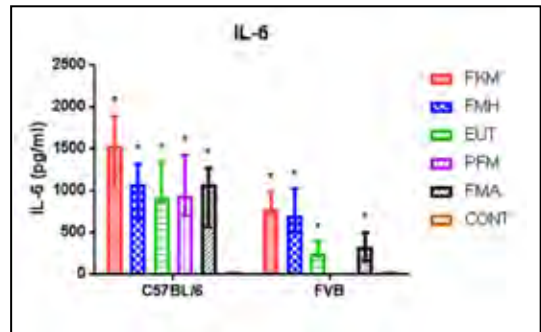
Afbeelding 5: Vrije vetzuren gemeten in het plasma aan het eind van het experiment bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).

*P < 0,05 vergeleken met de controle van de specifieke muizenstam.



Afbeelding 6: IL-6 gehalte gemeten in het plasma aan het eind van het experiment bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).

*P < 0,05 vergeleken met de controle van de specifieke muizenstam.



Afbeelding 7: TNFα gehalte gemeten in het plasma aan het eind van het experiment bij verschillende anesthesiemixen; FKM (Fentanyl-Ketamine-Midazolam), FMH (Fentanyl-Midazolam-Haldol), PFM (Propofol-Fentanyl-Midazolam), FMA (Fentanyl-Midazolam-Acepromazine) en EUT (Pentobarbital Natrium).

Conclusies en aanbevelingen

Elk anestheticum heeft bijwerkingen (ook de oude standaard FFM) die het onderzoek meer of minder beïnvloeden. Een bredere keuze aan anesthesiecombinaties geeft de mogelijkheid om gericht nadelige bijwerkingen van anesthesie te ontwijken. De FMA combinatie kan een goed alternatief bieden voor de gangbare mixen, hoewel de dosering van met name Acepromazine nauw luistert. Uit onze pilotproeven bleek dat bij te hoge dosering bloeddruk en hartslag snel verlaagd worden. De lage insulinespiegels ten gevolge van de FMA dragen waarschijnlijk bij aan de initiële hogere bloedsuikerspiegels die werden waargenomen bij het gebruik van deze mix. Misschien ten overvloede: anesthesiedoseringen kunnen van lab tot lab variëren en moeten altijd in een pilot worden uitgetest.

PFM is een goed alternatief in de C57BL/6-, maar niet in de FVB muis. Voordeel van PFM is dat deze mix ook klinisch veel gebruikt wordt, zodat dieronderzoek met deze mix goed aansluit op de humane klinische situatie. Het voordeel van de Propofol mix is dat Propofol kortwerkend is en dat de muizen weer snel bijkomen.

>>

De Haldol mix is geschikt voor terminale experimenten maar niet om dieren te laten bijkomen omdat de dieren zeer lang onder anesthesie blijven met deze mix.

Euthasol blijft een mooi anestheticum, maar heeft ook nadelen. Om chirurgische diepte te verkrijgen moet hoog worden gedoseerd, hierdoor kan snel teveel gegeven worden. Dit kan aanleiding geven tot hoge uitval door effecten op het hart en ademdepressie in de proef (nauw therapeutische window). We willen in dit verband benadrukken dat de dieren worden beademd. Beademing gaat verzuring van het dier tegen en voorkomt slechte oxygenatie van de vitale organen. Zeker bij urenlange experimenten maakt beademing het verschil tussen slagen of falen, geen of hoge uitval aan dieren. Met Euthasol geanestheerde muizen blijven heel lang onder narcose, wat ongunstig is voor totale recovery. Euthasol is uitsluitend geschikt voor terminale experimenten.

Wel moet worden opgemerkt dat de gemeten vetzuurspiegel hoog is. Normaal is deze tussen de 0.3-0.8mM. In ons experiment zijn deze waarden verhoogd omdat het bloed in heparine is afgenomen. Kleine hoeveelheden heparine werden aan de dieren gegeven om te zorgen dat de bloeddruk continu geregistreerd kon worden zonder dat er bloedstolsels ontstonden. Het is bekend dat heparine in het bloed lipoproteïne lipase (LPL) vrijmaakt uit de vaatwand. Als dit LPL dan in de bloedbuis terechtkomt, breekt het heel snel de vetten af in de lipoproteïnedel-tjes van het bloed, waardoor de vrije vetzuurconcentraties opeens sterk verhoogd zijn (3). Als de verschillende anesthesiemixen met elkaar worden vergeleken, geeft alleen de FKM geen verhoging van FFA t.o.v. de controlemuis. Als onderzoek speciaal gericht wordt op FFA, dient er rekening gehouden te worden met dit heparine-effect op de bepaling van de FFA.

Bij het begin van nieuw onderzoek moet worden bepaald wat de primaire uitleesparameter is. Het is dan noodzaak om die anesthesische mix te kiezen die deze primaire parameter zo min mogelijk beïnvloedt; het hele panel aan mixen kan u daarbij helpen. Een volledig en uitgebreider verslag van voorliggend onderzoek, met relevante referenties, is te vinden in de literatuur(4).

Literatuur

- 1 Koeman A *et al* (2015). *Invloed van veel gebruikte anesthesiemiddelen op fysiologische parameters van de muis*. *Biotechniek* 54/5: 25-33.
- 2 Flecknell P (2009). *Anaesthetic management*. Laboratory Animal Anaesthesia. 3rd edn. San Diego, CA: Academic Press, 81-2.
- 3 Zuurbier CJ *et al* (2008). *Perioperative hyperinsulinaemic normoglycemic clamp causes hypolipidemia after coronary artery surgery*. *British Journal of Anaesthesia* 100:442-450.
- 4 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.

