

Bereiken van optimale muizenanesthesie

A. Koeman¹, C.J. Zuurbier², M. Emons⁴, W.J. Florijn³, C. Ince¹

¹ Laboratorium voor Fysiologie (A.Koeman@amc.uva.nl),

² Afd. Anesthesiologie,

³ Proefdierdeskundige, AMC-Universiteit van Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam,

⁴ Experimentele Cardiologie, UMC Utrecht, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht

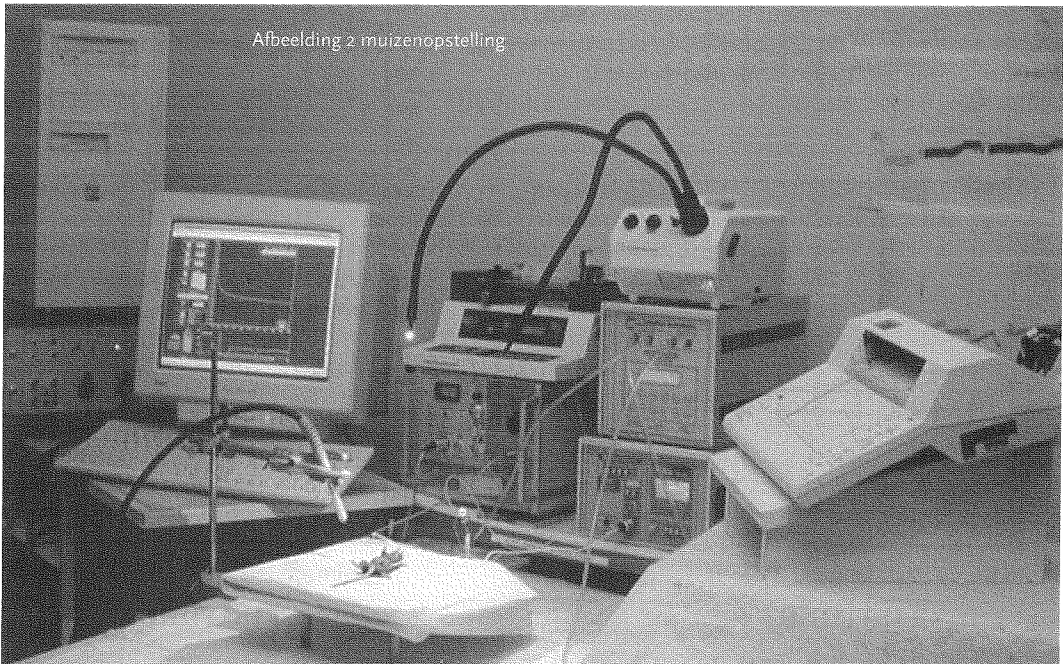
Inleiding

Op het AMC werden voor longfunctieonderzoek zes muizen tegelijk gedurende ongeveer zes uur intratracheaal (Positive End Expiratory Pressure = 5 mm Hg) beademd met 50% zuurstof en 50% stikstof. Het onderzoek richtte zich op longschade, zodat isofluraan niet gebruikt kon worden omdat bekend is dat deze stof zelf longschade oplevert. Daarom werd gekozen voor de gangbare injectiemix fentanyl-fluanisone-midazolam (FFM). Helaas bleek met FFM het niet mogelijk de dieren zes uur pijnvrij en fysiologisch stabiel te houden en gingen de meeste muizen voortijdig dood. De onderzoekster kwam op aanraden van de proefdierdeskundige naar mij toe, omdat op onze afdeling met behulp van een ketamine-medetomidine-atropine (KMA)-mix de muizen wel langdurig stabiel en pijnvrij aan de beademing liggen.

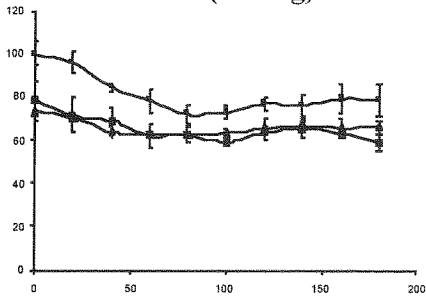
Onze afdeling heeft voor verschillende anestetica-mixen (1) uitgezocht welke dosering voor een goede anesthesiediepte én een stabiele natuurgetrouwe hartslag en bloeddruk geschikt zijn.

Op grond van een stabiele bloeddruk van meer dan 75 mm Hg en een hartslagfrequentie van minimaal 350 slagen per minuut (bpm) bleek KMA als injectiemix het meest geschikt. De waarden zijn de gemiddelden over een drie uur durend anesthesieprotocol.

Afbeelding 2 muizenopstelling



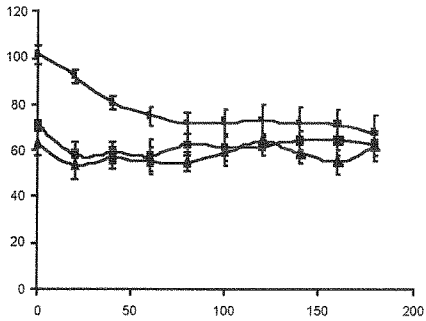
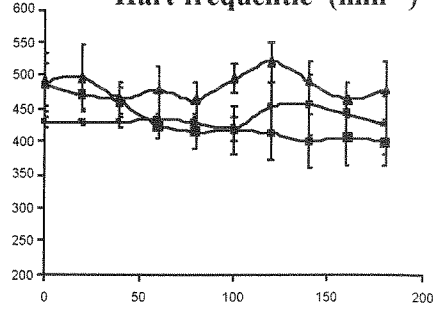
MAP (mmHg)



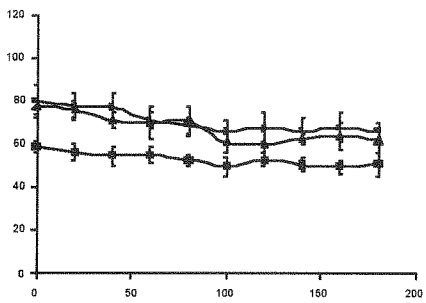
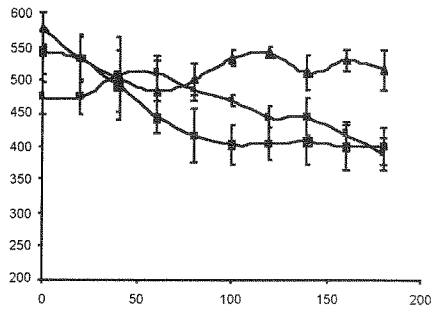
Swiss



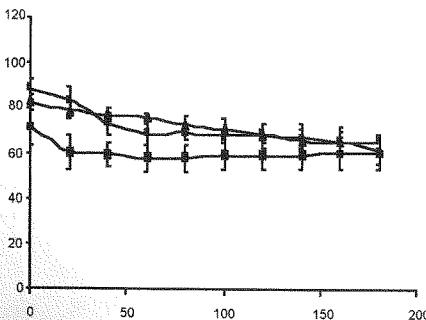
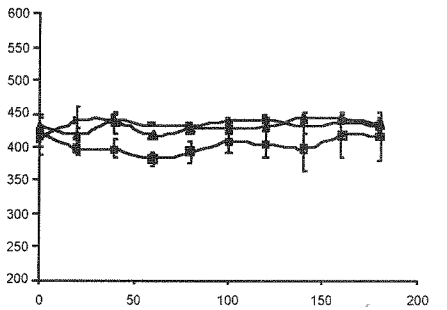
Hart frequentie (min⁻¹)



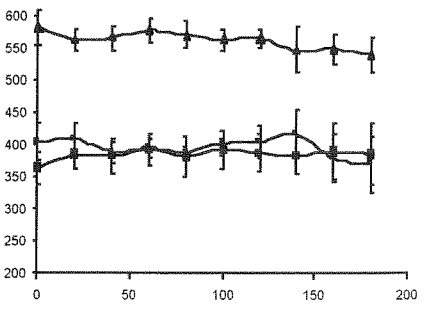
CD-1



BalbC



C57Bl6



Tijd (min)

Tijd (min)

(gemiddelde \pm SEM) tijdens 180 min. mechanische ventilatie van verdoofde muizen. Voor de verdoving zijn drie verschillende anesthesie combinaties onderzocht bij drie verschillende, veel gebruikte, muizenstammen. Atropine is bij daling van de hartslag tot <300 bpm bijgegeven en niet op standaardtijdstippen.

Tabel 1. Eigenschappen van de stoffen van de KMA-mix

Ketamine

- dissociatief anestheticum:
- veroorzaakt een relatief hoge bloeddruk en compenseert daardoor het effect van medetomidine.
- Als het i.p niet te snel ingespoten wordt blijft de ademhalingsfunctie intact (NMDA-antagonist).
- speekselafscheiding wordt gestimuleerd.

Medetomidine (Domitor)

- sedativum en analgeticum
- veroorzaakt een verlaging van de bloeddruk en de hartslag (α_2 -agonist).
- antagonistisch met atipamezole (Antisedan)

Atropine

- parasymphaticolyticum
- veroorzaakt een verhoging van de hartslag en compenseert daardoor het effect van medetomidine,
- remt de speeksel- en mucusafscheiding

Effect van KMA, isofluraan en FFM op bloeddruk en hart frequentie

Het doel van het onderzoek was te bepalen welk anestheticum, bij een goede chirurgische anesthesiediepte, de meest optimale dynamica van het bloed liet zien. Bij de inductie van de anesthesie wordt de muis (Swiss, CD-1, Balb/c of C57BL/6), na het i.p. inspuiten van de inductiemix, onder de warmtelamp gezet om afkoeling te voorkomen. De muis reageert binnen ongeveer tien minuten niet meer op de tussenteenreflex en kan geschoren worden op de te opereren gebieden. Er werd een tracheotomie uitgevoerd voor de beademing. De tracheotomie werd gekozen omdat de experimenten terminaal waren en dit een simpele manier is van intuberen. De muis werd mechanisch beademd (halfopen beademingssysteem) met een Columbus-ventilator (instellingen: frequentie 110, ratio 0.35, volume 0.3), ondersteund met 50% O₂ en 50% N₂. Het toevoegen van extra O₂ voorkomt verzuring van de muis. Voor de bloeddrukregistratie werd de *arteria carotis* gecanuleerd en voor het vloeistofonderhoud en bloedafname werd de *vena jugularis* gecanuleerd.

De registratie van bloeddruk en hartslag is voor ons werk noodzakelijk. Het voordeel is dat je ook pijn kunt waarnemen door middel van de bloeddruk- en hartslagregistratie. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd door middel van een pijnprikkel (tussenteenreflex). Als de anesthesiediepte onvoldoende is, zal dat als eerste zichtbaar zijn aan de hartslag. Deze gaat bij een pijnprikkel een paar slagen omhoog. De bloeddruk kan op het moment van de pijnprikkel een paar mmHg stijgen. Hierna komt pas het terugtrekken van het pootje en trillen van de snorharen. Dus door gebruik te maken van meerdere meet-

Tabel 2. Samenstelling van de KMA-mixen

Concentraties	Inductiemix Dosis: 0.075 ml/10g	Onderhoudsmix Dosis: 0.1 ml/10g/uur	Atropinemix Dosis: 0.03 ml/10g
Ketamine (Nimatek®) 100 mg/ml	1.25 ml (125 mg/kg)	0.72 ml (36 mg/kg)	–
Medetomidine (Domitor®) 1 mg/ml	0.2 ml (0.2 mg/kg)	0.08 ml (0.04 mg/kg)	–
Atropinesulfaat 0.5 mg/ml	1.0 ml (0.5 mg/kg)	0.3 ml (0.075 mg/kg)	0.1 ml (0.15 mg/kg)
NaCl 0.9 %	5 ml (5 ml/kg)	18.9 ml (9.95 ml/kg)	0.9 ml (2.9 ml/kg)

Voor bijspuiten van anesthesie bij tussenteenreflex 3.3 ml inductiemix per kg.

methoden van pijnwaarneming kan men streven naar verfijning en vermindering.

Het is voor het verkrijgen van de juiste fysiologische waarden noodzakelijk dat de bloeddruk en hartfrequentie zo dicht mogelijk bij de normaalwaarden (450-500 bpm) zitten, zodat de muis niet al door de operatie op zich in een slechte fysiologische conditie komt. In afbeelding 1 worden de drie verschillende anesthesieprotocollen bij vier verschillende muizenstammen vergeleken voor de bloeddruk (MAP: mean arterial pressure) en de hartfrequentie. De afbeelding laat zien dat zowel isofluraan (iso) als KMA betere resultaten opleveren dan FFM (fentanyl veroorzaakt o.a. bradycardie; ter compensatie kan atropine als parasympaticolyticum gegeven worden; dit is hier echter niet gebeurd). FFM veroorzaakt een lagere bloeddruk en veroorzaakt een licht dalende hartfrequentie. Onder de verschillende gebruikte muizenstammen zijn verschillen in bloeddruk en hartfrequentie. We zien dat KMA bij de Swiss- en CD-1-muizen de hoogste bloeddruk geeft. Voor de Balb/c en C57BL/6 zijn zowel KMA als isofluraan aan te raden voor het krijgen van een goede bloeddruk. De beste hartfrequenties worden met behulp van isofluraan verkregen voor de Swiss-, CD-1- en C57BL/6-muizen. Bij Balb/c-muizen geven alle drie de anesthesiecombinaties gelijke hartfrequenties.

Onze KMA-mix wijkt af van die in het boek Proefdierekunde (2): hier staat beschreven ketamine-xyzazine (100 mg/kg; 5-10 mg/kg) of ketamine-medetomidine (75 mg/kg; 1 mg/kg) omdat deze niet geschikt bleken voor langdurig gebruik met voldoende anesthesiediepte en een goede bloeddruk en hartfrequentie.

Voor de anesthesieopbouw gebruiken we een inductiemix en een onderhoudsmix (Tabel 2). De inductiemix wordt gemaakt met 12.5 mg/ml ketamine + 20 µg/ml medetomidine + 50 µg/ml atropine. De i.p.-

toedieningsdosis hiervan is 10 ml/kg. Voor een langdurige anesthesie leggen wij een i.p.-onderhoudsinfuus aan. Wanneer een i.p.-onderhoudsinfuus om praktische redenen niet haalbaar is wordt regelmatig de onderhoudsmix i.p. bijgespoten. De onderhoudsmix wordt gemaakt met 3.5 mg/ml ketamine + 3.5 µg/ml medetomidine + 7.5 µg/ml atropine. De toedieningsdosis hier van is 10 ml/kg/uur i.p. Bij controle van de anesthesiediepte kan wel eens een tussenteenreflex optreden. De muis krijgt dan een dosis van 5.6 mg/ml ketamine + 9 µg/ml medetomidine + 22.3 µg/ml atropine per kg lichaamsgewicht (Tabel 2).

In verschillende studies in de muis wordt ketamine ook gebruikt in combinatie met de α_1 - α_2 -agonist xyzazine. Deze studies (3), waarbij geen atropine werd gebruikt, lieten vaak een lage hartslagfrequentie (onder 350 bpm) of slechte pijnstilling (4) zien. Daarom besloten wij om de ketamine te combineren met een andere α_2 -agonist, namelijk medetomidine. Ook kozen wij voor een lage hoeveelheid medetomidine om een minimale verlaging van de hartfrequentie te verkrijgen. Niettemin zagen wij toch een hartfrequentie onder 300 bpm, die genormaliseerd kon worden door atropine (vagolyticum) te geven. Hiermee konden we uiteindelijk de hartslagfrequentie grotendeels normaliseren. De meeste muizenstammen zijn zeer gevoelig voor een α_2 -agonist, maar bij de FVB-muis treedt hierdoor geen verlaging van de hartfrequentie op.

De hartslagfrequentie moet enigszins fysiologisch blijven (300 bpm). Als je de hartslag kan monitoren heb je de mogelijkheid bij een te lage hartslag de muis 166 µg/kg atropinesulfaat bij te spuiten, waardoor de hartslag weer boven 300 bpm komt. Om een adequaat hartminuutvolume (HMV) te houden is het belangrijk dat de hartfrequentie minstens 300 bpm blijft. Het HMV is een belangrijke parameter voor het waarborgen van een goede doorbloeding van de organen en het op peil houden van de bloeddruk. Het HMV wordt bepaald door het slagvolume en de frequentie. De atropine kan niet zomaar uit de mix worden weggelaten of naar goedgevoelden worden verlaagd: bij het langdurige longfunctieonderzoek bleek dat een lagere atropinedosering resulteerde in sterfte.

De mix voldoet uiteraard ook voor kortdurende ingrepen. Wel was de ervaring van sommige gebruikers dat het, afhankelijk van de muizenstam, gewicht en leeftijd, vrij lang kan duren voordat de tussenteenreflex helemaal weg is. Wanneer de tussenteenreflex na tien minuten nog bestaat wordt een derde van de dosering inductiemix bij gespoten.

Behalve de hartfrequentie zijn er nog twee

Tabel 3. Bloedgasanalyse

Bloedgasanalyse van arterieel bloed van een C57/BL6-muis na vier uur mechanische ventilatie met KMA-verdoving. ABE is de base excess (BE); pO_2 is de partiële zuurstofspanning; pCO_2 , is de partiële kooldioxidespanning

bloedgaswaarden	KMA-anesthesie	bereik
pH	7.196	7.35 - 7.45
pCO_2	42.2 mmHg	35 - 45 mmHg
pO_2	95.7 mmHg	83 - 108 mmHg
Zuur-base status		
ABE	-11.8 mmol/L	-2 - (+3) mmol/L
HCO ₃ C	15.7 mmol/L	21 - 28 mmol/L

parameters waarop wij de muizen monitoren. Dit zijn de bloeddruk en de bloedgasen. De bloeddruk moet minstens 60 mmHg zijn. Bij een lagere bloeddruk ben je eigenlijk een muis in shock aan het bestuderen. Ook door een bloedgasanalyse (Tabel 3.) kan het fysiologische effect van de anesthesie bekeken worden. Zo is het belangrijk dat de waarden van de bloedgasen binnen een bepaald gebied liggen. De pH moet tussen de 7.35-7.45 liggen, de arteriële pCO₂ tussen de 35-45 mmHg, de arteriële PO₂ boven 80 mmHg. Het totaal hemoglobinegehalte moet >14 g/dl zijn en de zogenaamde base excess (BE) moet liggen tussen de -2 en de +3 mmol/l.

Stel dat de parameters er uitzien zoals in Tabel 3 (hier is alleen de BE en de pH afwijkend), dan betekent dat dat er na vier uur verzuring is opgetreden. Dit kan eventueel verholpen worden door lactaat toe te dienen (vervanging NaCl door Ringerslactaat).

De muizen die onder KMA-anesthesie zijn geweest, zijn langer dizzy door de ketamine, althans in vergelijking met muizen die FFM-anesthesie hebben gehad.

Daarnaast wordt er in de literatuur (5,6) gemeld dat ketamine de ogen doet uitpuilen en blaasontleding tegengaat (hyperglycemie en ADH-secretie omlaag). Beide verschijnselen zien wij eigenlijk niet bij gebruik van de KMA-mix. Onze ervaring met de KMA-mix liet in ieder geval geen opgeblazen blaas zien bij muizen die drie uur lang verdoofd waren. Uitdrogen van de ogen (bijzonder pijnlijk voor een muis) kan voorkomen worden door het gebruik van steriele oogzalf tijdens de operatie.

Ervaringen met andere anesthetica

Naast KMA als injectie-anestheticum, hebben we ook gekeken naar urethaan/ α -chloralose, pentobarbital en ketamine-etomidate (7). Om een goede diepte van anesthesie te krijgen moesten we minstens 1 g/kg urethaan en 65 mg/kg chloralose gebruiken in combinatie met 435 mg/kg tribromoethanol (Avertin®). Helaas waren de bloeddrukken dan erg laag (50-60 mmHg) en bovendien instabiel. Met pentobarbital (Nembutal®) moesten we minimaal 80-90 mg/kg geven om een goede diepte van verdooving te krijgen. Ofschoon we bij deze hoeveelheid pentobarbital bloeddrukken kregen die gelijk waren die verkregen onder isofluraan- of KMA-anesthesie reageerden de dieren soms nog steeds op pijnprikkels en gingen door het pentobarbital twee van de zeven dieren dood. Positieve ervaringen werden wel verkregen met KMA-inductie, gevolgd door i.p.-onderhoudsinfuus van ketamine 10 mg/kg/hr in combinatie met etomidaat

(Hypnomidaat®) 5 mg/kg/uur. Etomidaat is een kortwerkend hypnothericum met geringe effecten op het cardiovasculaire systeem. Vooral voor langdurige experimenten geeft deze anestheticacombinatie goede resultaten voor bloeddruk en hartfrequentie.

Conclusies

Wij raden aan per onderzoek verschillende anesthetica uit te proberen om voor het specifieke onderzoek de meest optimale verdooving te hebben. Belangrijk hierbij is dat de fysiologische toestand van het verdoofde dier zoveel mogelijk overeenkomt met de homeostase van het gezonde, niet-verdoofde dier, zodat verkregen resultaten niet vertroebeld worden door een al 'zieke' conditie, veroorzaakt door sub-optimale verdooving. De resultaten van een recente studie van een groep uit Maastricht (8) zijn in grote lijnen in overeenstemming met onze bevindingen.

Wij hebben veel aandacht besteed aan de anesthesie-effecten omdat wij proeven willen doen in een fysiologisch natuurgetrouwe goed geanestheseerde muis. Hierdoor krijg je minder verschillen in je resultaten en wordt het effect van anesthesie op de verkregen resultaten verminderd.

Literatuur

- 1 Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C (2002) *Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282: H2099-H2105
- 2 Hellebrekers LJ, Booijs LHDJ (2003) *Anesthesie, analgesie en euthanasie*. Pp 245-290 In: Handboek proefdierkunde (LFM van Zutphen, V Baumans & AC Beynen eds). Elsevier Gezondheidszorg, Maarssen
- 3 Furukawa S, MacLennan MJ, Keller BB (1998) *Hemodynamic response to anesthesia in pregnant and nonpregnant ICR mice*. Lab Anim Sci 48: 357-363
- 4 Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T (2001). *Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: Drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth*. Comp. Med. 51:443-456
- 5 Castroman PJ, Ness TJ (2002) *Ketamine, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, inhibits the reflex responses to distension of the rat urinary bladder*. Anesthesiol 96: 1410-9
- 6 Flecknell P (1996) *Laboratory Animal Anesthesia*. London: Academic Press
- 7 Zuurbier CJ (2004). *Mouse anesthesia in relation to optimal hemodynamics*. In: The Physiological Genomics of the Critically Ill Mouse (C Ince ed.). Kluwer Academic Publishers Ince C
- 8 Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL (2004). *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287:H1618-H162