

FARMACOLOGISCH ONDERZOEK VAN MYC 1080 (STERCURONIUM),
EEN NIEUWE KORTWERKENDE MOTORISCHE-EINDPLAATREMMER

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van
doctor in de geneeskunde
aan de Medische Faculteit te Rotterdam
op gezag van de dekaan dr. J. Moll,
hoogleraar in de faculteit der geneeskunde,
tegen de bedenkingen van het college van dekanen
uit de faculteit der geneeskunde te verdedigen op

woensdag 15 maart 1972

te 16.00 uur door

JACOB WIERIKS

Geboren te Pijnacker in 1919

Promotor : Prof. dr. I.L. BCNTA

Co-referenten : Prof. dr. E.J. ARIËNS (Nijmegen)
Prof. dr. E.L. NOACH (Leiden)

INDEX

	pagina
INLEIDING	5
HOOFDSTUK I - VRAAGSTELLING	7
HOOFDSTUK II - DE NEUROMUSCULAIRE OVERDRACHT	11
HOOFDSTUK III - KEUZE VAN HET WERKINGSTYPE	22
HOOFDSTUK IV - KEUZE VAN HET CHEMISCHE TYPE	25
HOOFDSTUK V - PRIMAIRE SCREENING	34
HOOFDSTUK VI - BESCHRIJVING VAN DE ONDERZOEKINGEN, NODIG VOOR DE EVALUATIE VAN MYC 1080	57
HOOFDSTUK VII - BEVESTIGING EN TYPERING VAN DE HOOFDWERKING	59
HOOFDSTUK VIII - BIJWERKINGEN	70
HOOFDSTUK IX - TOXICOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN	78
HOOFDSTUK X - LOT IN HET ORGANISME	103
HOOFDSTUK XI - INTERACTIE MET ENKELE ANDERE IN DE ANESTHESIE GEBRUIKTE STOFFEN	126
SAMENVATTING EN CONCLUSIES	150
APPENDIX	155
SUMMARY AND CONCLUSIONS	156
OVERZICHT VAN DE GERAADPLEEGDE LITERATUUR	161



INLEIDING

Nieuwe geneesmiddelen komen vrijwel uitsluitend voort uit de researchinspanning van de farmaceutische industrie. Deze research is multi-disciplinair en indrukwekkend van omvang. De organisatie is dusdanig opgebouwd, dat een goede coördinatie van de activiteiten der diverse laboratoria wordt bereikt. Het overgrote deel van de researchactiviteiten in de farmaceutische sector is gericht op het ene doel: de ontwikkeling van een of enkele nieuwe geneesmiddelen. Gedeeltelijk echter bestaat het onderzoek dat de verschillende wetenschappelijke medewerkers verrichten uit z.g. vrije research: men kan vrij onderzoek verrichten op gebieden, waarin men persoonlijk is geïnteresseerd. Dit proefschrift is voortgekomen uit zulk een combinatie van gerichte en vrije research.

De geneesmiddelenresearch in de farmaceutische industrie is sterk fenomenologisch gericht; de theoretische aspecten komen pas op de tweede plaats. Over de relatie tussen deze twee vormen van farmacologie schrijft D.K. de Jongh in "Molecular Pharmacology" (1): "There are certain advantages in dividing pharmacology into two different fields which can be designated as phenomenological and theoretical pharmacology. Whereas these areas are different, they are not, of course, independent. They are unified by the same relationship that exists between phenomenological and theoretical physics. Phenomenological sciences describe processes; theoretical sciences try to establish relationships between phenomena and to explain them. In the explanation of directly observed phenomena one frequently proposes a hypothesis which attempts to relate the effect to the cause." Waar industrie en universiteit samenwerken, ontstaat een vruchtbaar samenspel tussen fenomenologische en theoretische farmacologie. In zijn oratie toonde Bonta (2) zich dan ook terecht verheugd over de toenemende samenwerking tussen industrie en universiteit.

De inhoud van dit proefschrift bestaat voornamelijk uit een fenomenologische beschrijving van de voornaamste stadia in de ontwikkeling van een stof tot het onderzoek naar zijn klinische bruikbaarheid als geneesmiddel. Theoretische uitweidingen zijn tot een minimum beperkt.

Reeds werd opgemerkt, dat de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel een multi-disciplinaire aangelegenheid is. Dit houdt in, dat de in de volgende hoofdstukken beschreven onderzoekingen niet alle door mij persoonlijk zijn uitgevoerd, wèl echter onder mijn leiding of in nauwe samenwerking met anderen. Met dit proefschrift wil ik graag al mijn huidige en vroegere medewerkers eren. Enkelen mogen met name worden genoemd. De meeste farmacologische proeven werden op voortreffelijke wijze uitgevoerd door de Heer J.M. de Man. De specifieke moeilijkheden bij het toxicologische onderzoek werden uitstekend opgelost door de Heer C.H.C. van Veldhoven.

Waar problemen rezen van instrumentele aard, werd steeds met succes een beroep gedaan op de vindingrijkheid van de Heer B.L. van Kan.

De Heer J.S.C. Verschoor bewerkte de resultaten, waar nodig, statistisch, tekende de figuren en maakte uitstekende overzichten, die het samenstellen van dit proefschrift zeer vergemakkelijkten.

(1) De Jongh, D.K., in Medicinal Chemistry, a series of Monographs - nr. 3, edited by E.J. Ariëns.

(2) Bonta, I.L., "Verdwijnende kloven", (1970), Rotterdam.

De deskundigheid van Dr. W. Hespe was onontbeerlijk bij de studie van het "Lot in het organisme" (Hoofdstuk X).

Een woord van bijzondere dank aan Prof. Dr. J. P. Roos, cardioloog aan de Vrije Universiteit te Amsterdam, die de gemaakte electrocardiogrammen evalueerde, en aan Dr. H. E. Schornagel, patholoog-anatoom aan het Bergweg Ziekenhuis te Rotterdam, die in het kader van het toxicologisch onderzoek de door de Heer C. A. M. Gijben gemaakte microscopische preparaten van de organen bestudeerde.

Mej. C. P. J. M. Ritter heeft dit proefschrift gezien op taal en spelling en die waar nodig verbeterd.

Tenslotte een woord van erkentelijkheid aan de Raad van Bestuur en de Research Leiding van Gist-Brocades N. V., die mij in de gelegenheid stelden dit proefschrift te bewerken. Het spijt mij, dat het onderzoek niet heeft geleid tot een bruikbaar preparaat. Ofschoon de stof het gestelde ideaal benaderde, signaleerde de anesthesist P. V. Admiraal in zijn voortreffelijke klinische proeven een schoonheidsfout, die ons deed besluiten de stof, op de drempel van een veelbelovend klinisch leven, te laten vallen. It's all in the game.

De stof, waarvan de ontwikkeling tot het klinisch onderzoek in de volgende hoofdstukken wordt beschreven, draagt als codenaam Myc 1080.

Deze naam zal in de volgende bladzijden steeds worden gebezigd.

De World Health Organization (WHO) verleende aan deze stof de "generic name"

STERCURONIUM

HOOFDSTUK I

VRAAGSTELLING

1. Met het zoeken naar een nieuw geneesmiddel wordt beoogd een stof te vinden die zo mogelijk een verbetering betekent ten opzichte van bestaande geneesmiddelen of geneeswijzen. Men dient zich dus tevoren af te vragen, op welke punten de bestaande stoffen tekortschieten. Hierbij kan men zich laten voorlichten door ervaren clinici en door de literatuur.

Nadat op deze wijze de eisen zijn vastgesteld waaraan de nieuwe stof zal hebben te voldoen, dient het onderzoek op realisatie van deze eisen gericht te blijven. Tijdens de evaluatie komt het echter regelmatig voor, dat door beter inzicht op grond van experimentele ervaringen de eisen worden aangepast aan die bevindingen.

Bij de formulering van de eisen worden één of meer indicaties in het oog gevat.

2. Voor een perifeer werkend spierrelaxans gelden de volgende indicaties:

- in de anesthesie:

 - intubatie ten behoeve van kunstmatige beademing; ter verkrijging van voldoende spierverlamming om te kunnen opereren onder betrekkelijk lichte anesthesie.

- in de psychiatrie:

 - ter voorkoming van botfracturen gedurende elektroshocktherapie.

- in de inwendige geneeskunde en neurologie:

 - ter opheffing van spierspasmen bij tetanus en andere kramptoestanden.

Verreweg het grootste verbruik ligt in de anesthesie. Bij de formulering van de eisen, waaraan een perifeer spierrelaxans dient te voldoen, werd daarom voornamelijk dit indicatiegebied in het oog gehouden.

De in de kliniek meest gebruikte perifeer werkende spierrelaxantia zijn succinylcholine, d-tubocurarine, gallamine ¹⁾, alcuronium ²⁾ en recentelijk ook pancuronium ³⁾, alle motorische-eindplaatremmers.

Het pancuronium kwam pas beschikbaar nadat het hierna te beschrijven onderzoek grotendeels was voltooid; het alcuronium werd gelanceerd tijdens het onderzoek en kon nog als referentiestof in verschillende proeven meelopen.

3. Voor- en nadelen van de gebruikelijke eindplaatremmers

3.1. Succinylcholine

Voordelen

De werking zet zeer snel in, binnen één circulatietijd. Dit is vooral van belang bij het

¹⁾ Flaxedil^R ²⁾ Alloferin^R ³⁾ Pavulon^R

intuberen voor kunstmatige beademing: immers, zolang geen volledige paralyse is verkregen van de pharynx- en de larynxspieren, kan men de tubus niet inbrengen. Tijdens de wachtperiode ademt de patient nauwelijks of niet. Snel inzettende totale paralyse is dus nodig om de periode van anoxie zo kort mogelijk te houden. Een ander voordeel is de ultrakorte werking. Dit is vooral van belang voor kortdurende ingrepen. Voor langdurende zou men een continu infuus kunnen gebruiken, maar in deze gevallen kiest men liever een langer werkende stof.

Nadelen

Gedurende de anesthesie kunnen zich bij de inleiding van de relaxatie fasciculaties voordoen van de skeletspieren. Voorts ziet men profuse salivatie en bronchiaalsecretie optreden, die atropinistatie noodzakelijk maken. Ernstiger is de bradycardie: na herhaalde injecties binnen een bepaald tijdsinterval kan soms zelfs totale hartstilstand optreden. Door een soort "vagal escape" komt het hart in de regel weer langzaam op gang. De verklaring van deze bijwerkingen ligt althans ten dele in de parasymphomimetische eigenschappen van de stof, maar de hartstilstand na herhaalde injectie is een verschijnsel dat nog veel duistere kanten heeft.

Tenslotte zijn in de literatuur vermeld dodelijke spierspasmen en convulsies bij de mens en bij het varken (1).

Na de anesthesie treedt bij vele patienten ernstige spierpijn op, die verscheidene dagen kan duren.

Andere nadelen: de paralyse kan door geen enkele klinisch beschikbare stof geantagoniseerd worden. Dit is meestal niet erg, omdat de werking zeer kortdurend is, maar er komen patienten voor, die in hun plasma het pseudocholinesterase missen, dat de stof via het succinylmonocholine afbreekt tot het onwerkzame choline en barnsteen-zuur. Bij hen heeft de stof een langdurende werking, die aanhoudende kunstmatige beademing noodzakelijk maakt.

Tenslotte verhoogt succinylcholine de intraoculaire druk, waardoor het gecontraïndiceerd is bij glaucoma-patienten.

3.2. d-Tubocurarine

Voordelen

De werking is lang, waardoor de stof bruikbaar is tijdens lange operaties en bij tetanus. Bovendien is de werking antagoneerbaar.

Nadelen

De latente tijd tussen injectie en efficiënte paralyse van de pharynx- en larynxmusculatuur is te lang om tijdelijke beademing "op de hand" overbodig te maken. Daarom wordt door de meeste anesthesisten ten behoeve van een snelle intubatie de spierrelaxatie dan ook ingeleid met succinylcholine.

De stof maakt bovendien histamine vrij en heeft een ganglionblokkerende werking, waardoor de bloeddruk, ook reeds bij therapeutische doseringen, sterk daalt. Sommige anesthesisten en chirurgen vinden dit geen nadeel, zelfs een voordeel, omdat hierdoor bloedverlies wordt tegengegaan (Churchill-Davidson, persoonlijke mededeling).

De histamine-vrijmaking leidt bovendien tot bronchospasmen, die niet te bestrijden zijn met antihistaminica. Dit nadeel telt vooral bij astma- en bronchitis-patienten.

De lange werking, tenslotte, maakt postoperatieve toediening van cholinesteraseremmers en bewaking van de patient (mogelijk ademstilstand door recuraristatie) in de meeste gevallen noodzakelijk.

(1) Hall, L.W., Woolf, M., Bradley, J.W.P. & Jolly, D.W., Brit. Med. J., 2 (1966), 1305.

3.3. Gallamine

Voordelen

De werking is minder lang dan die van d-tubocurarine, waardoor de stof bruikbaar is voor kortdurende operaties. Postoperatief behoeft dan ook minder vaak een antagonist te worden gegeven en is de kans op plotseling optredende ademstilstand kleiner.

De stof maakt geen histamine vrij.

De werking is antagoneerbaar.

Nadelen

Evenmin als d-tubocurarine is gallamine bruikbaar voor intubatie.

Door vagusblokkade ontstaat vaak een tachycardie, die hoog kan oplopen.

3.4. Alcuronium

Voor deze stof geldt ongeveer hetzelfde als voor gallamine, met dit verschil, dat geen vagusblokkade optreedt.

3.5. Pancuronium

Deze stof is, afhankelijk van de diersoort, 5-10 maal zo actief als d-tubocurarine.

Bij equieffectieve doseringen is de werkingsduur van pancuronium evenwel ongeveer gelijk aan die van d-tubocurarine zowel bij de kat (1) als bij de mens (2).

4. Eisen, te stellen aan het nieuwe perifeer werkende spierrelaxans

Zoals reeds onder 3.2. vermeld, is de meest gangbare praktijk eerst succinylcholine te spuiten om snelle intubatie mogelijk te maken en dan een langer werkende stof zoals d-tubocurarine te geven om een paralyse van ongeveer de gewenste duur te verkrijgen. Dit is, zoals uit Hoofdstuk II en III zal blijken, farmacologisch gezien onlogisch, omdat deze twee stoffen in het eindplaatgebied elkaars antagonisten zijn. Het zou niet alleen de procedure vereenvoudigen, maar ook dit ongewenste antagonisme elimineren, wanneer een stof zou kunnen worden gevonden, waarvan ten behoeve van een snelle intubatie de werking even snel en compleet inzet als die van succinylcholine en waarvan de werkingsduur door al dan niet bijspuiten goed regelbaar is van zeer kort tot lang. Stelt men bovendien als eis, dat zo'n stof ook alle andere voordelen van de bestaande preparaten in zich verenigt en de nadelen ervan mist, dan komt men tot de volgende selectiecriteria:

- 4.1. snel inzettende werking: binnen 1-2 circulatietijden totale paralyse, ook van de pharynx- en larynxmusculatuur.
- 4.2. korte werkingsduur: 10-15 minuten durende volledige paralyse.
- 4.3. antagoneerbaar door een specifieke antagonist.
- 4.4. geen histamine-vrijmaking.

(1) Buckett, W.R., Marjoribanks, C.E.B., Marwick, F.A. & Morton, M.B., Brit.J. Pharmacol., 32 (1968), 671.

(2) Baird, W.L.M. & Reed, A.M., Br.J. Anaesth., 39 (1967), 775.

- 4.5. redelijke marge tussen ganglionblokkerende en eindplaatremmende activiteit.
- 4.6. geen invloed van betekenis op bloeddruk en/of hartfrequentie.
- 4.7. geen verhoogde produktie van speeksel en bronchiaalsecreet.

Hieraan nog toe te voegen:

- 4.8. onbetekenende placenta-passage.

In dat geval komt een per sectio caesarea geboren kind goed ademend ter wereld, als bij de moeder tijdens de operatie spierrelaxatie is toegepast. Maar ook is de kans op teratologische afwijkingen geringer wanneer de operatie van de a. s. moeder plaats vindt gedurende de organogenese van het kind.

Tenslotte nog:

- 4.9. geen toxische bijwerkingen van betekenis.

HOOFDSTUK II

DE NEUROMUSCULAIRE OVERDRACHT

Na de formulering van de eisen, waaraan een eindplaatremmer moet voldoen om een bijdrage te leveren in het therapeutische armamentarium, komt de vraag aan de orde: welk werkingstype verdient de voorkeur?

Voor een goed begrip van de indeling van perifere spierrelaxantia in verschillende werkingstypen is het nuttig een hoofdstuk te wijden aan de anatomie en de fysiologie van de neuromusculaire overdracht.

Omdat hierbij algemeen fysiologische begrippen aan de orde komen, zullen deze in een inleiding over de fysiologie van de prikkelbare membraan worden omschreven.

Bij het samenstellen van dit overzicht zijn naast de geciteerde publikaties werken geraadpleegd van Guyton (1), Ruch en Patton (2), Cookson en Paton (3), Hodgkin (4) en Bowman et al. (5).

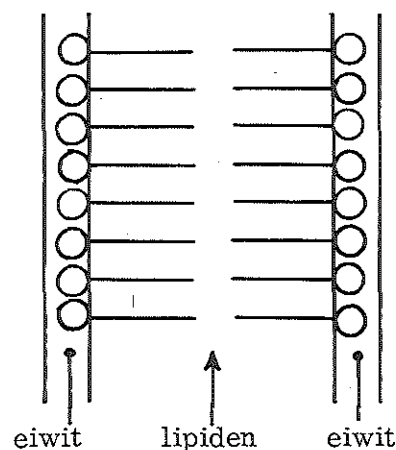
1. Fysiologie van de prikkelbare membraan

1.1. Structuur

De membraan is opgebouwd uit een dubbellaagje van lipiden, aan twee zijden begrensd door een dun eiwitlaagje. De lipiden bestaan voornamelijk uit fosfatiden, die met hun geïoniseerde groepen gekoppeld zijn aan tegengesteld geladen groepen van eiwitmoleculen en aan vrije ionen (Ca^{++} , Na^+ , K^+).

De vetzuren ketens zijn gerangschikt in een dubbellaag, zoals aangegeven in de figuur. Tussen de fosfatiden bevinden zich in het lipidenlaagje nog fosfatidezuren en cholesterol.

De membraan is niet homogeen en continu, maar bezit poriën van wisselende en veranderende grootte. Deze poriën dragen een positieve elektrische lading, voornamelijk veroorzaakt door Ca^{++} , gebonden aan de eiwitten van de membraan.



- (1) Guyton, A.C., Textbook of Medical Physiology, 3rd Ed. (1968), Saunders, Philadelphia.
- (2) Ruch, Th.C. & Patton, H.D., Physiology and Biophysics, 19th Ed. (1966), Saunders, Philadelphia.
- (3) Cookson, J.C. & Paton, W.D.M., Anaesthesia 24 (1969), 395.
- (4) Hodgkin, A.L., The Sherrington Lectures VII (1967), Liverpool Univ. Press.
- (5) Bowman, W.C., Rand, M.J. & West, G.B., Textbook of Pharmacology, 4th printing (1971), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

1.2. Permeatie van ionen

Door de membranen kunnen velerlei stoffen de cel binnendringen en verlaten. Dit geschiedt door middel van diffusie zowel via de lipidenlaag (lipofiele stoffen) als via de poriën (hydrofiele stoffen). Naast diffusie spelen ook actieve transporten een rol. Voor de verklaring van de prikkelbaarheid van de membraan is slechts het ionentransport van belang. Daarom zullen in het navolgende alleen de ionenbewegingen worden besproken.

Het ionentransport vindt plaats via de poriën en wordt beheerst door de volgende factoren:

1.2.1. Passief transport

- de poriëngrootte
- de lading van de poriën
- de ladingsgradiënt via de membraan: de prikkelbare membraan is, zoals straks zal blijken, aan de extracellulaire kant positief en aan de intracellulaire zijde negatief geladen.
- de effectieve grootte van de ionen, d.w.z. de diameter van de gehydrateerde ionen.
- de lading van de ionen, waarvan zowel het teken als de valentie een rol speelt.
- de concentratie-gradiënt van de permeërende ionen.

1.2.2. Actief transport

Hieronder wordt verstaan een transport via de membraan in een richting die niet wordt bepaald door de onder 1.2.1. genoemde factoren, maar door een energie-vragend proces dat de ionen stuurt in een door de cel bepaalde richting, zelfs tegen een ladings- of concentratiegradiënt in.

Het energetische aspect - waarbij o.a. ATP betrokken is - wordt uitgedrukt in de term "pompen". Men spreekt van een Na^+ -pomp en van een K^+ -pomp. Deze twee transporten zijn gekoppeld en tegengesteld gericht: de Na^+ -pomp perst Na^+ -ionen van binnen naar buiten en de K^+ -pomp K^+ -ionen van buiten naar binnen. Omdat passieve permeatiemogelijkheden van gehydrateerde Na^+ -ionen veel geringer zijn (100 maal zo klein) dan van de kleinere gehydrateerde K^+ -ionen, is de Na^+ -pomp veel belangrijker (ook kwantitatief) dan de K^+ -pomp. Andere ionen blijven buiten beschouwing. Slechts zij vermeld dat de cel Mg^{++} -ionen behandelt als K^+ -ionen en Ca^{++} -ionen als Na^+ -ionen.

De resultante van actief en passief transport van allerlei permeabele ionen, zowel kationen als anionen, leidt tot ionenverdeling, waarbij Na^+ -ionen voornamelijk extracellulair en K^+ -ionen voornamelijk intracellulair worden geconcentreerd, resulterend in een membraanpotentiaal van -85 mV (inwendig negatief).

1.3. De actiepotentiaal

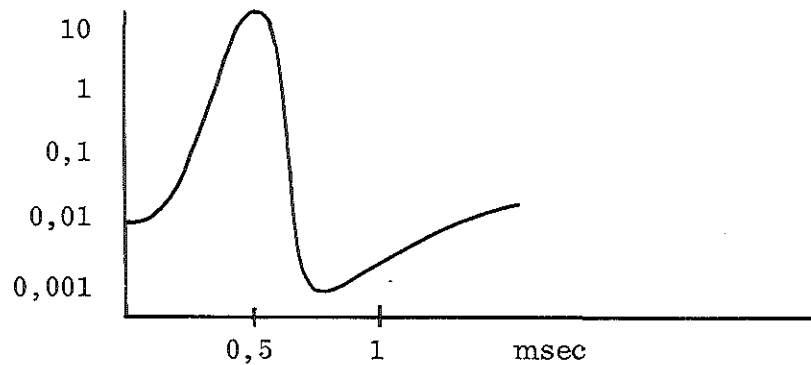
1.3.1. Depolarisatie

De Na^+ -pomp handhaaft tegen alle diffusiepotentialen in de membraanpotentiaal op -85 mV, de z.g. rustpotentiaal. Door een (supra)maximale prikkel neemt de effectieve poriëngrootte toe. Een van de hypothesen is, dat aan de negatieve kathode Ca^{++} -ionen worden losgemaakt uit de poriën. Daardoor wordt de positieve lading van de poriën lager. Dit heeft weer tot gevolg, dat de diffusie van positieve (Na^+ , K^+) en negatieve (Cl^-) ionen toeneemt. Beperken we ons tot Na^+ -ionen en K^+ -ionen, dan zien we dat aanvankelijk de diffusiesnelheid van Na^+ -ionen korte tijd sterk stijgt, vrij spoedig compensatoir gevolgd door K^+ -ionen, waarvan de diffusie minder sterk maar langduriger toeneemt, en omdat deze ionen zich in tegengestelde richting bewegen, is het duidelijk dat er aanvankelijk een netto influx van positieve lading is, die wordt gevolgd door een netto efflux.

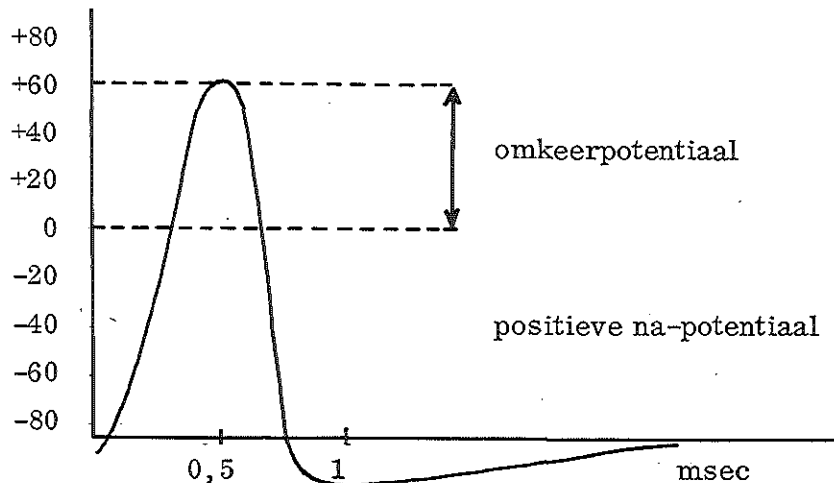
De in rusttoestand uitwendig positief en inwendig negatief geladen membraan wordt daardoor tijdelijk gedepolariseerd: de verhoudingen keren zelfs gedurende korte tijd om, zo-

dat de membraanpotentiaal van -85 mV omslaat in $+60$ mV (omkeerpotentiaal). Dit is een "self-limiting" proces: immers, de stijgende positieve lading (tot $+60$ mV) binnen remt de Na^+ -bewegingen meer en meer af en bevordert de tegengestelde K^+ -bewegingen. De Ca^{++} -ionen keren terug in de poriën en de repolarisatie voltrekt zich.

verhouding
diffusie-
snelheden
 Na^+/K^+



membraan-
potentiaal



Kwantitatief is de ionenbeweging tijdens deze processen niet erg groot. In feite is het netto resultaat, dat er na afloop slechts weinig meer Na^+ -ionen binnen zijn dan er voordien waren. Dit teveel wordt door de Na^+ -pomp weer verwijderd. Elektrisch uit zich de activiteit van de Na^+ -pomp in deze fase als een positieve na-potentiaal (50 msec). De Na^+ -pomp is dus niet de oorzaak van de repolarisatie. Zelfs als alle pompen volledig zijn geblokkeerd, kan een zenuwvezel vele honderdduizenden depolarisaties doormaken, voordat zij niet meer kan werken.

Het teveel aan K^+ -ionen aan het oppervlak van de membraan verdwijnt met de uitwendige vloeistofstromen in de circulatie. Ook dit is weinig. Grote doseringen van depolariserende stoffen, zoals succinylcholine, kunnen echter door massale depolarisaties van o. a. spiermembranen de K^+ -concentratie in de circulatie verhogen.

1.3.2. Voortplanting van de depolarisatie

De lokale stijging van de Na^+ -ionen-concentratie aan de binnenzijde van de membraan is er de oorzaak van, dat deze ionen zich ook verspreiden naar het aangrenzende, rustende deel van de membraan. Dit deel wordt daardoor ook gedepolariseerd. Door de

afgenomen ladingsgradiënt neemt de doorlaatbaarheid voor Na^+ -ionen en compensatoir voor K^+ -ionen toe, zodat zich hier dezelfde processen afspelen als op de oorspronkelijk geprikkelde plaats. De depolarisatie breidt zich in twee richtingen uit, onmiddellijk gevolgd door een even snelle repolarisatie.

Leidt men met gevoelige galvanometers deze elektrische fenomenen af, dan registreert men het beeld van de z.g. actiepotentiaal.

1.4. Accommodatie en desensitisatie

Tijdens de inwerking van een continu elektrische prikkel kan een "repetitive response" ontstaan. De reeks actiepotentialen wordt echter begrensd door de geleidelijke afneming van de prikkelbaarheid van de membraan tijdens de inwerking van de continue prikkel; ondanks het voortduren van de prikkel voltrekt zich een repolarisatie. Dit proces heet accommodatie.

Voortbouwende op de hypothese (1.3.1.) dat Ca^{++} -ionen belangrijk zijn voor de effectieve poriëngrootte in de membraan en daarmee voor de diffusiemogelijkheden van Na^+ -ionen, kan men accommodatie verklaren uit een geleidelijke toeneming van de Ca^{++} -concentratie in de omgeving van de (negatieve) kathode. Dit is in overeenstemming met de waarneming, dat een zenuwvezel, die normaal zeer snel accommodeert, dit in een Ca^{++} -vrij milieu in het geheel niet meer doet.

Wanneer de continue prikkel een chemische is, spreekt men van desensitisatie. Een voorbeeld hiervan is het decamethonium. Deze stof bindt zich aan de acetylcholine-receptor van de eindplaatjes en depolariseert deze; heeft aldus dezelfde werking als acetylcholine. Het gevolg is, dat de door indirecte prikkeling opgewekte spiercontracties gepotentieerd worden. Omdat het decamethonium niet door acetylcholinesterase wordt afgebroken, duurt zijn depolariserende werking veel langer dan die van acetylcholine. Dit heeft twee consequenties:

1. decamethonium werkt als continue prikkel en veroorzaakt een "repetitive response", leidend tot fasciculaties van de spier.
2. zolang de depolarisatie duurt, is acetylcholine niet in staat de receptor te stimuleren.

Er bestaat derhalve een competitief synergisme tussen decamethonium en acetylcholine.

Tijdens de occupatie van de receptor door decamethonium ontstaat evenwel desensitisatie. Dit heeft tot gevolgen:

1. door de verminderde gevoeligheid van de receptor voor decamethonium is het effect van een volgende dosering kleiner of zelfs geheel afwezig.
2. de periode van potentiëring en fasciculaties is begrensd.
3. de receptor kan nu wel door acetylcholine gedepolariseerd worden.

Er ontstaat dus een competitief antagonisme tussen acetylcholine en decamethonium, dat met neostigmine in het voordeel en met d-tubocurarine in het nadeel van acetylcholine verschoven kan worden.

Decamethonium veroorzaakt aldus een z.g. "dual block" (1), achtereenvolgens bestaande uit een competitief synergistische en een competitief antagonistische fase. Deze laatste fase wordt door sommigen "phase II-block" genoemd (2).

De snelheid van desensitisatie verschilt van species tot species en binnen een species soms van spier tot spier, zodat als uitersten gevonden worden een zuiver depolarisatie-block, bijvoorbeeld van de M. tibialis anterior van de kat, en een vrij snel optredend

(1) Zaimis, E.J., J. Physiol., 122 (1953), 238.

(2) Foldes, F.F., in "Curare", Symposium der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, Zurich (1966), Schwabe Verlag, Basel.

phase II-block, bijvoorbeeld van de M. soleus van de kat.

Deze verschillen heeft men wel gerelateerd aan de kleur van de spier: witte zouden een depolariserend, rode een dual block vertonen na decamethonium. Sedert de publikatie van Alderson en Maclagan (1) en van Vrbová (2) kan men dit niet meer volhouden: de rode ademhalingspijpen van de kat gedragen zich bij dezelfde temperatuur en hetzelfde prikkelpatroon net als de witte M. tibialis anterior.

Door de snelheid waarmee een prikkel toeneemt klein genoeg te kiezen is het mogelijk te bereiken, dat de accommodatie (resp. desensitisatie) sneller verloopt dan de prikkelsterkte. Er ontstaat dan geen depolarisatie: de prikkel sluipt in. Op deze wijze zou het mogelijk moeten zijn door langzame injectie van decamethonium bij gemakkelijk desensiterende spieren een neuromusculair block te verkrijgen zonder voorafgaande fasciculaties.

De boven gegeven verklaring voor het ontstaan van fasciculaties en potentiëring door depolariserende stoffen, zoals decamethonium, is niet volledig. Behalve de "repetitive response" speelt nog een ander mechanisme een rol, nl. repetitieve depolarisatie van de pre"synaptische" membraan, aan het uiteinde van de zenuwvezel (3). Hierdoor kunnen via axonreflexen contracties van hele motorische eenheden ontstaan.

Omdat de γ -vezels ook cholinergisch zijn, neemt de contractietoestand van de spierspoeltjes door direct of indirect werkende depolariserende stoffen toe, waardoor zij gevoeliger worden voor rekking. Dit kan bij geïnnerveerde spieren via ruggemereflexen verder bijdragen tot het ontstaan van fasciculaties.

1.5. Facilitatie

Een ontoereikende prikkel verhoogt wel de permeabiliteit van de membraan voor Na^+ -ionen zodanig dat de membraanpotentiaal stijgt, d.w.z. minder negatief wordt, maar niet voldoende om een volledige depolarisatie te verkrijgen. Er ontstaat slechts een "local excitatory state"; die ongeveer 15 msec duurt en zich lokaal ook uitbreidt in de omgeving van het aangrijpingspunt van de prikkel. Gedurende deze periode is de drempel voor een andere of volgende prikkel verlaagd: men spreekt van facilitatie. Mits snel genoeg opeenvolgend, kan een aantal op zichzelf ontoereikende prikkels met behulp van facilitatie tot een volledige depolarisatie aanleiding geven ("temporal summation"). Ook gelijktijdig op aangrenzende plaatsen toegediende ontoereikende prikkels, waarvan de gebiedjes van "local excitatory state" elkaar overlappen, kunnen tot een actiepotentiaal leiden ("spatial summation").

Een "local excitatory state" van een postsynaptische membraan, teweeggebracht door een stimulerende overdrachtstof (bijv. acetylcholine), wordt een "excitatory postsynaptic potential" (e.p.s.p.) genoemd. Dezelfde potentiaalverandering op de acetylcholinereceptor in de motorische eindplaat heet eindplaatpotentiaal (e.p.p.).

2. Neuromusculaire overdracht

2.1. Anatomie

Een motorische zenuwvezel vertakt zich aan het uiteinde in verscheidene takjes. Deze verliezen terminaal hun myeline-schede. Elk takje eindigt in een ellipsvormig plaatje.

(1) Alderson, A.M. & Maclagan, J., J. Physiol., 173 (1964), 38.

(2) Vrbová, G., J. Physiol., 169 (1963), 513.

(3) Koelle, G.B., (1962), cit. Goodman, L.S. & Gilman, A., "The pharmacological Basis of Therapeutics", 4th Ed., (1970), p.420.

Dit maakt contact met een spiervezel die rondom dit uiteinde sterk geplooid is (de zoolplaat). De primaire synapsspleet (400-500 Å) is de tussenruimte tussen eindplaat en spiervezel, de secundaire synapsspleet (200-300 Å) wordt gevormd door de ruimte tussen de plooien. Het woord synapsspleet, dat algemeen wordt gebruikt, is niet juist, omdat een synaps per definitie de structuur is die twee neuronen met elkaar verbindt, terwijl hier sprake is van een contact tussen een neuron en een spiervezel. Beter zou zijn de uitdrukking neuromusculaire spleet.

De membraan van het zenuwuiteinde, foutief de pre-"synaptische" membraan genoemd, is evenals de membraan van de spiervezel (post-"synaptische" membraan) opgebouwd als alle prikkelbare membranen (lipoidlaagje aan beide zijden begrensd door een dun eiwitlaagje). Aan het oppervlak is dit eiwitlaagje bedekt met mucopolysacchariden, de z.g. basaal-membraan.

Zowel de zenuwuiteinden als de zoolplaat bevatten veel mitochondriën, hetgeen wijst op een sterke enzymactiviteit. In de zenuwuiteinden vindt men bovendien een groot aantal blaasjes, elk gevuld met ongeveer 3000 moleculen acetylcholine. Op de toppen van de zoolplaatplooien en aan de rand van de zoolplaat bevindt zich het enzym acetylcholinesterase (zie figuur 1).

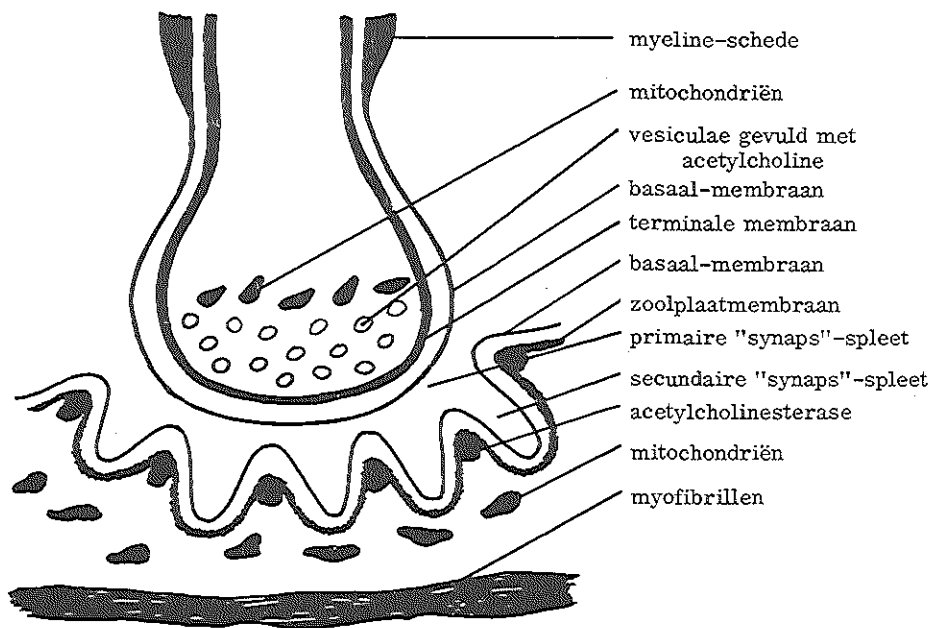


Fig. 1 - Schematische voorstelling van de neuromusculaire overdrachtsstructuur.

2.2. Fysiologie

2.2.1. Acetylcholine-synthese

Algemeen werd aangenomen, dat de mitochondriën acetylcholine maken uit acetaat en choline met behulp van coenzym A en ATP. Volgens nieuwere opvattingen vindt de synthese echter plaats in het cytoplasma. Het wordt gestapeld in de blaasjes. Van de benodigde bouwstoffen moet het choline uit de extracellulaire vloeistof worden opgenomen met behulp van satureerbare carriers. De snelheid van opneming kan daardoor de beperkende factor zijn bij de acetylcholine-synthese.

Hemicholinium (HC3) reageert competitief met choline op de carriers.

2.2.2. Afgifte van acetylcholine

Als een impuls aankomt aan het eind van de zenuwvezel, wordt de terminale membraan gedepolariseerd. Daardoor dringt Ca^{++} naar binnen en wordt een aantal blaasjes naar het oppervlak getrokken. De Ca^{++} -ionen zouden de blaasjes doen barsten, waardoor acetylcholine vrijkomt in de neuromusculaire spleet. Mg^{++} -ionen antagoneren dit proces. In rust ledigt zich per zenuwuiteinde ongeveer elke seconde spontaan een aantal blaasjes, waardoor quanta van vele duizenden acetylcholinemoleculen vrijkomen. Deze verhogen de permeabiliteit van de zoolplaat voor Na^+ en K^+ . Hierdoor daalt de membraan-potentiaal een heel klein beetje (1 mV): miniatuureindplaatpotentiaal (m.e.p.p.).

Depolarisatie van de zoolplaat en voortgeleiding van de depolarisatie langs de spiervezel ontstaan pas, wanneer onder invloed van een impuls die het uiteinde van de zenuwvezel bereikt minstens 300 quanta gelijktijdig worden vrijgemaakt.

De betekenis van de plooiing van de zoolplaat is, dat door oppervlaktevergroting "spatial summation" (zie 1.5.) mogelijk wordt. Het gevolg is, dat de eindplaatpotentiaal (e.p.p.) de drempel overschrijdt waardoor depolarisatie optreedt. (Onder e.p.p. wordt verstaan de verandering van de membraanpotentiaal in de omgeving van de acetylcholine-receptoren).

Normaliter wordt per impuls meer dan voldoende acetylcholine afgegeven om de post-"synaptische" drempel te overschrijden (zie: Safety factor), maar boven een impulsfrequentie van 150 per seconde neemt de hoeveelheid acetylcholine per impuls vrij snel zodanig af, dat niet alle impulsen effectief worden (vermoeidheid). Zulke frequenties worden fysiologisch zelden bereikt. Na een indirecte faradische prikkeling wordt de zoolplaat tijdelijk meer prikkelbaar: posttetanische facilitatie. Hiervoor zijn enkele verklaringen mogelijk. De eerste verklaring zou kunnen zijn, dat de presynaptische membraan door de vele rupturen van blaasjes zodanig is veranderd, dat tijdelijk lediging van de volgende blaasjes gemakkelijker gaat; een andere verklaring, dat de extracellulaire vloeistof ter plaatse door de grote activiteit verandert in ionensamenstelling in die zin, dat het K^+ tijdelijk verhoogd is. Dit gekoppeld aan een verlaagd intracellulair K^+ verhoogt de potentiaal van de postsynaptische membraan, m.a.w. er ontstaat een soort "excitatory post synaptic potential" (e.p.s.p.).

Safety factor

Zoals eerder is gezegd, wordt gewoonlijk per impuls meer acetylcholine afgegeven dan nodig is om de postsynaptische drempel te overschrijden. Deze overmaat kan voor verschillende vezels van een hele spier variëren van een factor 3 tot een factor 20. Deze factor heet safety factor. Dit garandeert, dat elke impuls die langs de zenuwvezel de spiervezel bereikt, effectief zal zijn (= de "drempel" overschrijdt). Dit heeft consequenties voor de activiteit van eindplaatremmende stoffen. Wanneer men de werking van een competitieve, niet-depolariserende eindplaatremmer beschouwt als functie van de dosis,

zullen bij een verhouding van 3 op 1 t.o.v. de geproduceerde hoeveelheid acetylcholine bepaalde spiervezels uitvallen; pas bij een verhouding = 20 zullen de voor de eindplaatremmende stof minst gevoelige vezels geblokkeerd worden. Anders gezegd: de safety factor daalt met stijgende dosering van een niet-depolariserende eindplaatremmer. De contractiekracht van de spier zal daardoor geleidelijk afnemen, de contractieamplitudo kan bij een onbelaste spier nog lang ongewijzigd blijven. Het omgekeerde gebeurt, wanneer een dergelijke stof uitgewerkt raakt. Dan zullen de spiercontracties weer schijnbaar geheel zijn teruggekeerd, terwijl nog een groot aantal spiervezels geblokkeerd is. Kleine doseringen van depolariserende stoffen zullen door drempelverlaging de safety factor vergroten.

2.2.3. De acetylcholinereceptor

De geïnnerde spiervezel is slechts gevoelig voor acetylcholine ter plaatse van de motorische eindplaat. Dit pleit voor specifieke structuren in het eindplaatgebied: de z.g. acetylcholinereceptoren.

Waser (1) meent met radioactief gemerkt curare de lokalisatie van de receptoren autoradiografisch zichtbaar te kunnen maken. Hiertegen zijn wel enige bedenkingen in te brengen. Zo is het merkwaardig, dat na denervatie van de spiervezel de gevoeligheid voor acetylcholine zich uitbreidt over de hele spiervezel. Deze nieuw gevormde receptoren zijn met de Waser-techniek niet zichtbaar te maken. Daarom lijkt het niet onmogelijk dat de affiniteit van curare voornamelijk betrekking heeft op de mucopolysacchariden van de basaal-membraan en niet specifiek op de receptoren. Ook wij hebben, zoals later zal blijken, aanwijzingen gevonden dat Wasers voorstelling van zaken niet geheel bewezen is.

Veel werk is verricht om de structuur van de acetylcholinereceptor op te helderen. Chagas (2) heeft uit het elektrische orgaan van de sidderaal *Electrophorus electricus* zure mucopolysacchariden geïsoleerd, waaraan curare-achtige stoffen zich reversibel kunnen binden. Of deze macromoleculen slechts acceptoren, ook wel "sites of loss" genoemd, zijn, dan wel deel uitmaken van de specifieke receptoren, is nog een vraag. De moeilijkheid bij alle pogingen de receptor-moleculen te isoleren is, dat van de massa van bijvoorbeeld een spiervezel de receptor slechts een zeer kleine fractie uitmaakt. Bovendien is de kans zeer groot, dat de receptor bij isoleren dusdanig van ruimtelijke vorm verandert, dat hij zijn specifieke eigenschappen verliest en niet meer herkenbaar is.

Een andere mogelijkheid om de receptor in handen te krijgen is hem in het intacte weefsel eerst te binden met een specifieke remstof en dan het complex te isoleren. Nodig hiervoor is een hechting van receptor aan remstof, die de bewerkingen van de isolatie trotseert.

Men kan tot hypothesen over de receptor-structuur komen door deze te beschouwen als complement van structureel bekende specifieke remstoffen. Tot heden zijn alle voorstellingen grotendeels speculatief. Wel is het zeker, dat de receptor een z.g. "anionic site" en een "active site" moet bezitten. De "anionic site" is mogelijk een fosfaatgroep, hetgeen zou blijken uit de affiniteit van de receptor voor uranylionen. Verder zijn er aanwijzingen voor de aanwezigheid van SS-bruggen vlak bij de "active site". Reductie hiervan leidt tot tijdelijk verlies van gevoeligheid voor acetylcholine. De SS-bruggen verraden de aanwezigheid van peptidestructuren. De binding van de "onium"-groep van depolariserende stoffen aan de "anionic site" bepaalt de intrinsieke

(1) Waser, P.G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 144 (1967), 737.

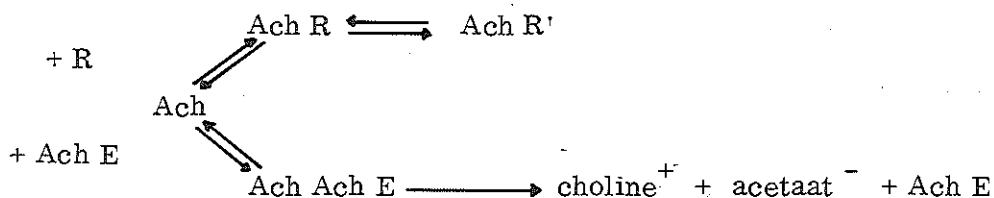
(2) Chagas, C., Ann. N.Y. Acad. Sci., 81 (1959), 345.

activiteit (i. c. het vermogen de receptor te depolariseren). Die activiteit is hoger naarmate de binding sterker is en minder wordt gehinderd door de substituenten (bijv. acetylcholine). Worden de substituenten groter en lipofieler, dan neemt de intrinsieke activiteit af en de affiniteit tot het receptorgebied toe (1). Zo ontstaat een geleidelijke overgang van depolariserende naar niet-depolariserende stoffen met grote affiniteit en afwezige intrinsieke activiteit. Deze laatste behoren tot de groep van niet-depolariserende eindplaatremmers. Is van een reversibele binding sprake (bijv. d-tubocurarine), dan kan de remming competitief worden geantagoniseerd met een depolariserende stof. Is de binding niet reversibel of grijpt de remmende stof aan buiten de acetylcholinereceptor, dan spreekt men van een niet-competitieve niet-depolariserende stof.

Waarschijnlijk is het complex, dat acetylcholine met de receptor vormt, inactief. Door vormverandering gaat het over in een actieve depolariserende structuur (2). Zeer onlangs heeft Smythies (3) met behulp van Corey-Pauling-Kalturn-modellen een structuur geconstrueerd van de acetylcholinereceptor, gebaseerd op de veronderstelling, dat hierin zouden zijn betrokken eiwit, fosfolipiden, prostaglandines en Ca^{++} . Hiermee worden ook de verschillen in acetylcholinereceptoren van het muscarine- en nicotine-type onderscheiden. Met dit model - door ons niet op zijn merites te beoordelen - zouden vele gevonden wetmatigheden op het gebied van stof-receptorinteractie ongedwongen verklaard kunnen worden. In het artikel voorgestelde proeven zullen verdere evidentie moeten leveren voor de juistheid van de hypothese.

2.2.4. (Acetyl)cholinesterase

Acetylcholine (Ach) heeft ook affiniteit tot het enzym acetylcholinesterase (Ach E) in het eindplaatgebied. Nadat het zich hieraan gebonden heeft, wordt het acetylcholine snel afgebroken tot choline + acetaat. Deze reactie verloopt in competitie met de binding van acetylcholine aan de echte receptoren (R):



Omdat de reacties behalve de afbraak van acetylcholine, evenwichtsreacties zijn, loopt het geschetste proces snel af in de richting van choline + acetaat. Hierdoor duurt de werking van acetylcholine slechts kort en wordt desensitisatie voorkomen. Stoffen die zich wel binden aan de receptoren en niet worden afgebroken door acetylcholinesterase, kunnen na een initiële depolarisatie een langer durend block veroorzaken door occupatie en desensitisatie van de receptoren ("dual block").

Dat acetylcholine een affiniteit heeft voor zowel receptor als acetylcholinesterase betekent nog niet, dat deze "receptoren" identiek zijn. Dit blijkt duidelijk uit het feit,

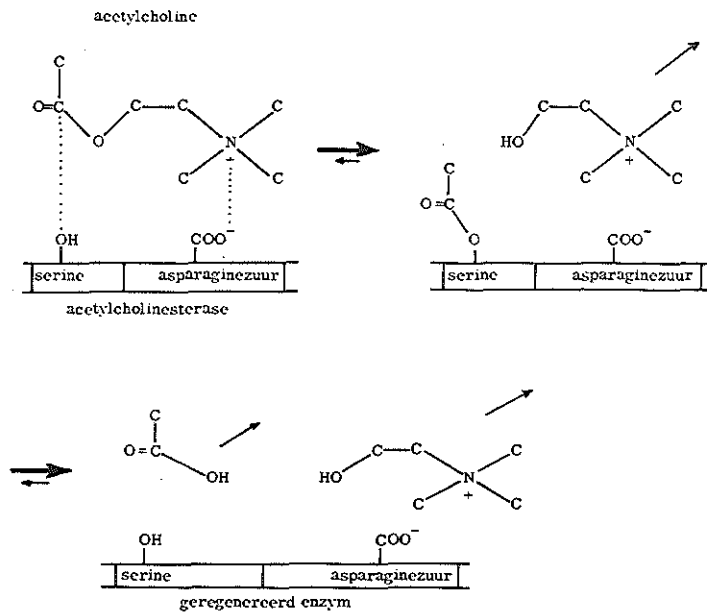
-
- (1) Van Rossum, J.M. & Ariëns, E.J., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 118 (1959), 393.
 - (2) Rang, H.P. & Ritter, J.M., Molec. Pharmacol., 5 (1969), 394.
 - (3) Smythies, J.R., Eur. J. Pharmacol., 14 (1971), 268.

dat cholinesteraseremmers, zoals neostigmine, een hoge affiniteit bezitten voor het enzym en een lage affiniteit voor de receptor. Het omgekeerde is waar voor d-tubocurarine.

Het verschil in activiteit van beide stoffen komt duidelijk tot uiting in het verschil in invloed op de eindplaatpotentiaal. Door occupatie van een deel der receptoren met d-tubocurarine is het aantal voor depolarisatie beschikbare receptoren kleiner dan normaal. De veranderingen in de membraanpotentiaal als gevolg van de werking van acetylcholine zijn in toto dus kleiner: afname van de eindplaatpotentiaal. Door occupatie van een deel der enzymen door neostigmine wordt de afbraak van acetylcholine vertraagd. Het gevolg is, dat er relatief gezien meer receptoren bezet worden door acetylcholine: stijging van de eindplaatpotentiaal.

Het is te verwachten, dat er structuur-overgangen bestaan tussen stoffen met een vrijwel zuivere affiniteit voor het enzym en stoffen met een vrijwel zuivere affiniteit voor de receptor. In de groep met affiniteit voor de receptor zijn, zoals eerder opgemerkt, weer overgangen mogelijk tussen stoffen met kleine affiniteit en grote intrinsieke activiteit enerzijds, stoffen met grote affiniteit en geringe of afwezige intrinsieke activiteit anderzijds (1).

Het acetylcholinesterase bevat een "anionic site", die bestaat uit een COO^- - groep, opgeleverd door het aminozuur asparaginezuur, waaraan de "onium"-groep van acetylcholine zich bindt, en een "esteratic site", die bestaat uit een OH-groep, afkomstig van het serine (2), die met acetylcholine dusdanig reageert, dat een omestering plaats vindt, waarbij de OH-groep zich bindt aan het azijnzuur van het acetylcholine. Het hierbij vrijkomende choline verlaat de anionic site en wordt afgevoerd. Door hydrolyse wordt tenslotte het azijnzuur van de esteratic site verwijderd, waarna de oorspronkelijke situatie is hersteld. Schematisch:



Met neostigmine gebeurt in wezen hetzelfde. Omdat echter de laatste stap in het proces, i.c. afsplitsing van het dimethylcarbaminezuur, meer dan een miljoen maal zo traag verloopt als de afsplitsing van azijnzuur, gedraagt het neostigmine zich als een acetylcholinesteraseremmer.

- (1) Ariëns, E. J., Van Rossum, J. M. & Simonis, A. M., *Arzneim. Forsch.* 6, (1956), 611.
 (2) Linssen, G. H., *Academisch Proefschrift* (1961), Nijmegen.

Edrophonium is geen ester en bindt zich met zijn oniumgroep uitsluitend aan de "anionic site". Deze binding is snel reversibel, hetgeen de korte werkingsduur verklaart.

Aan de andere kant binden organische fosfaten zich door fosforilyering vrijwel irreversibel aan de "esteratic site".

De splitsing van acetylcholine door acetylcholinesterase geschiedt zeer snel: de hoeveelheid per impuls vrijgemaakte acetylcholine wordt afgebroken in 40-60 microseconden (1). Bedenkt men dat de absoluut refractaire periode van de zenuwvezel ongeveer 0,5 msec (= 500 microseconden) duurt, dan volgt hieruit onmiddellijk, dat het met indirecte faradische prikkeling onmogelijk is, zonder gelijktijdige cholinesteraseremming aan de eindplaat of een pre-"synaptische" secretiebevordering, een verhoging van de acetylcholine-concentratie te bereiken.

(1) Lawler, H.C., J. Biol. Chem., 234 (1959), 799. Cit. Handbuch exp. Pharmakol., XV (1963), 706.

HOOFDSTUK III

KEUZE VAN HET WERKINGSTYPE

In zijn proefschrift heeft Linssen (1) bruikbare criteria beschreven, op grond waarvan men de perifere spierrelaxantia kan indelen volgens werkingstype. Hij onderscheidt:

Type I - depolariserende stoffen, bv. succinylcholine, decamethonium.

Type II - competitieve niet-depolariserende stoffen, bv. d-tubocurarine.

Type III - niet-competitieve niet-depolariserende stoffen, bv. prestonal.

Type IV - stoffen, die de synthese van acetylcholine remmen:
bv. hemicholinium, dat de opname van choline remt.

Type V - stoffen, die de secretie van acetylcholine remmen:
bv. Mg^{++} , botulinustoxine.

Type VI - acetylcholinesteraseremmers, bv. neostigmine.

Deze indeling behoeft na het overzicht van de neuromusculaire overdracht, gegeven in Hoofdstuk II, geen nadere toelichting.

Tegen de gebruikte nomenclatuur kan men bezwaren inbrengen. De aanduiding volgens type-nummer is ongewenst. Wanneer men de werkingstypen in één groep farmaca mag nummeren, is dit in principe ook in andere groepen geoorloofd.

Een nummer is nietszeggend. Daarom zou het beter geweest zijn in plaats van een type-nummer een werkingsaanduiding te geven of een benaming naar de meest bekende representant van een type.

De indeling volgens Linssen wordt nog wat overzichtelijker, wanneer men het aangrijpingspunt mede in beschouwing neemt. Zo komt men tot:

1. Stoffen, die pre-"synaptisch" werken

1.1. Remmers van de acetylcholine-synthese: bv. hemicholinium = Type IV.

1.2. Remmers van de acetylcholine-secretie: bv. Mg^{++} , botulinustoxine = Type V.

2. Stoffen, die post-"synaptisch" werken

2.1. Depolariserende stoffen

2.1.1. direct werkend: bv. succinylcholine, decamethonium = Type I.

2.1.2. indirect werkend via cholinesteraseremming, bv. neostigmine = Type VI.

(1) Linssen, G.H., Academisch Proefschrift (1961), Nijmegen.

2.2. Niet-depolariserende stoffen

2.2.1. competitief werkend: bv. d-tubocurarine = Type II.

2.2.2. niet-competitief werkend: bv. prestonal = Type III.

In navolging van Van Rossum en Ariëns (1) vat Linssen al deze werkingstypen samen onder de naam curariforme stoffen. Wij hebben deze naam niet overgenomen, omdat hij onbedoeld slechts een type II-werking suggereert.

Gaan wij thans na welke van de gegeven typen in het licht van de in Hoofdstuk I gestelde eisen wèl en welke niet in aanmerking komen.

Direct werkende depolariserende stoffen

De werking zet zeer snel in en duurt - althans van succinylcholine - kort, maar tot nu toe zijn geen goede antagonisten bekend. Met competitief werkende niet-depolariserende stoffen kan men soms de depolariserende stoffen van de receptoren verdringen, waardoor een non-depolarisatie-block ontstaat, dat weer kan worden opgeheven met het aan de zenuwuiteinden gevormde acetylcholine, zo nodig gesteund door een cholinesteraseremmer.

Andere nadelen van deze groep zijn: de bijwerkingen van autonome aard, bv. succinylcholine-bradycardie en de postoperatieve spierpijnen.

Indirect werkende depolariserende stoffen

Ofschoon de werking snel inzet en er zeker wel een cholinesteraseremmer te vinden is die kort werkt, moet gevreesd worden dat de bijwerkingen op andere plaatsen (synapsen en parasymphatische eindorganen) zo groot zullen zijn, dat de stof voor dit doel weinig geschikt is, al moet worden toegegeven dat bijvoorbeeld ambenonium een meer specifieke affiniteit heeft voor nicotine-receptoren dan voor de muscarine-receptoren.

Een ander bezwaar is, dat in hogere doseringen de stoffen ook een eigen depolariserende werking op de eindplaat hebben.

Competitief werkende niet-depolariserende stoffen

Deze stoffen werken snel, maar blijkens de ervaring nog niet snel genoeg voor intubatie; ze zijn van verschillende werkingsduur. Dit betekent, dat er een structuur denkbaar is, die de gewenste werkingsduur heeft.

Er zijn goede antagonisten bekend (cholinesteraseremmers).

De bijwerkingen van de verschillende vertegenwoordigers zijn niet gelijksoortig, dus ook op dit gebied zijn verbeteringen denkbaar.

Niet-competitief werkende niet-depolariserende stoffen

Doordat zij aangrijpen op de spiervezel, is geen van de gebruikelijke antagonisten in staat hun werking te antagoneren. Andere antagonisten zijn niet beschikbaar.

Het prototype prestonal is een sterke histamine-liberator en veroorzaakt tachycardie (2).

(1) Van Rossum, J.M. & Ariëns, E.J., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 118 (1959), 393.

(2) Griffith, H.R., Cullen, W.G. & Welt, P., Canad. Anaesth. Soc. J., 3 (1956), 346.

Acetylcholine-synthese-remmers

De werking van de tot heden bekende vertegenwoordigers van deze groep (hemicholinium) zet langzaam in, doordat na de synthese-remming eerst de voorraden uitgeput moeten raken voordat spierverslaving optreedt.

Er bestaat een schijnbaar antagonisme met cholinesteraseremmers. Deze vertragen nl. de afbraak van het steeds minder afgescheiden acetylcholine, zodat dit langer werkt. Door overmaat choline toe te voeren bereikt men een competitief antagonisme met een lange latente tijd, verklaarbaar uit het feit, dat de voorraden eerst weer aangevuld moeten worden.

Een ander bezwaar is de beperkte selectiviteit: de stoffen werken ook op andere plaatsen, waar acetylcholine de overdrachtstof is.

Acetylcholine-secretie-remmers

Wat betreft het Mg^{++} kan gezegd worden, dat de werking snel inzet en, afhankelijk van de dosis, een variabele duur heeft. Ca^{++} -ionen antagoneeren de werking. Mg^{++} heeft echter veel meer werkingen. Zo ontstaat er zeker ook een algemene anesthesie en een diurese.

Het botulinustoxine is voor dit doel niet toepasbaar vanwege de grote toxiciteit.

De kans is niet groot, dat er stoffen gevonden worden, die tot dit type behoren en aan de gestelde eisen voldoen, omdat aan de voorwaarde voldaan moet worden, dat de secretie van acetylcholine specifiek geremd wordt aan de uiteinden van de motorische zenuwen.

Vergelijken we bovenstaand overzicht met de in Hoofdstuk I, paragraaf 4, geformuleerde eisen die gesteld moeten worden aan een verbeterd perifeer werkend spierrelaxans, dan biedt de groep van de competitief werkende niet-depolariserende stoffen de meeste kans op het vinden van de ideale spierverslapper.

Volgens de experimentele criteria, gehanteerd door Linssen, wordt deze groep gekenmerkt door:

1. slappe verlamming zonder fasciculaties bij zoogdierspieren.
2. slappe verlamming zonder fasciculaties bij kikker- en vogelspieren.
3. antagoneerbaarheid door cholinesteraseremmers en door depolariserende eindplaatremmers, zowel bij zoogdier-, als bij kikker- en vogelspieren.
4. het tijdsverloop tussen het moment van injectie en het inzetten van de verlamming is kort.
5. geen of zwakke remming van cholinesterase.

In Hoofdstuk VII komen we hierop nader terug.

HOOFDSTUK IV

KEUZE VAN HET CHEMISCHE TYPE

In Hoofdstuk III concludeerden we, dat voor het bereiken van het gestelde doel: het synthetiseren van een stof die voldoet aan de in Hoofdstuk I geformuleerde eisen, het beste gezocht kan worden in de groep van de niet-depolariserende competitieve eindplaatremmers.

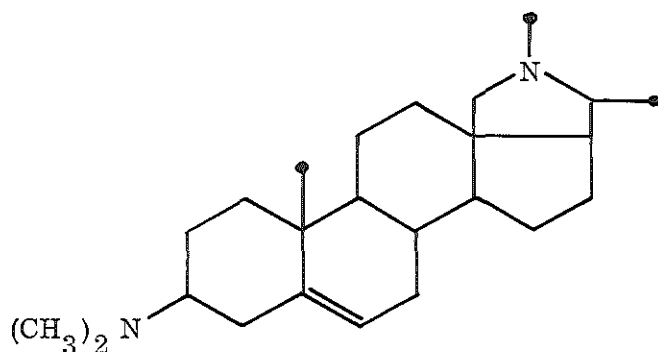
Volgens Van Rossum en Ariëns (1) hebben verbindingen tot die groep behorend grote substituenten aan de oniumgroep. Door deze substituenten kan de oniumgroep de complementaire plaats op de receptor niet bereiken. De intrinsieke activiteit is daardoor nul, terwijl de affiniteit tot (de omgeving van) de receptor behouden blijft of toeneemt.

De interactie met de agonist, het acetylcholine, wordt bepaald door de onderlinge verhouding tussen de affiniteiten en is competitief wanneer de affiniteit zowel voor agonist als voor antagonist bepaald wordt door de wet van de massawerking.

De kans op het vinden van de verbinding lijkt dus aanwezig, wanneer men een chemische groep uitkiest, die een of meer oniumgroepen bezit en grote substituenten. Het prototype van zo'n verbinding is d-tubocurarine (structuurformule zie pag. 43), een grote molecule met 2 N-kernen op een afstand van 12 Å. Tot voor kort werd algemeen aangenomen, dat deze beide N-atomen kwaternair zijn. Hierop is ook een aantal theorieën gebaseerd over de mozaiekachtige structuur van de receptoren: de equidistantie-theorie van Barlow en Ing (2), Paton en Zaimis (3) en de poriën-theorie van Waser (4). Deze voorstellingen van zaken bleken onvoldoende om alle structuur-werkingsrelaties te verklaren. Onlangs bewezen Everett, Lowe en Wilkinson (5), dat d-tubocurarine niet biskwaternair kan zijn, maar in feite monokwaternair is. Hiermee krijgen Gill en Ing (6) achteraf gelijk in hun veronderstelling, dat slechts één van de kwaternaire N-groepen in interactie treedt met de acetylcholine-receptor, terwijl de tweede N-groep (die dus niet kwaternair blijkt te zijn) zich met aangrenzende moleculen, "anchoring sites", bindt.

In ons researchprogramma werden destijds conessine-derivaten onderzocht. Deze steroidmoleculen hebben 2 tertiaire N-atomen op een afstand van 14 Å, welke ongeveer overeenkomt met die van d-tubocurarine en decamethonium, en zij bezitten een grote substituent aan de aminogroepen, het steroidskelet.

-
- (1) Van Rossum, J.M. & Ariëns, E.J., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 118 (1959), 393.
 - (2) Barlow, R.B. & Ing, H.R., *Brit.J.Pharmacol.*, 3 (1948), 298.
 - (3) Paton, W.D.M. & Zaimis, E.J., *Brit.J.Pharmacol.*, 4 (1949), 381.
 - (4) Waser, P.G., *Schweiz.Med.Wochenschr.*, 87 (1957), 577.
 - (5) Everett, A.J., Lowe, L.A. & Wilkinson, S., *Chem.Commun.*, 16 (1970), 1020.
 - (6) Gill, E.W. & Ing, H.R., *Il Farmaco Ed. Sci.*, 13 (1958), 244.



Conessine

Bonta (niet gepubliceerd) had met hoge doseringen van enkele conessine-derivaten reeds aangetoond, dat in de kat (*N.*-peronaeus - *M.*-tibialis-preparaat) een motorische-eindplaatremming optrad.

Op deze bevinding doorbordurend, hebben wij gemeend dat kwaternisering van één of van beide N-atomen in conessine deze werking wel eens zou kunnen versterken.

Dit bleek inderdaad het geval. Het loonde daarom de moeite een reeks gekwaterniseerde conessine-derivaten te bereiden, en te onderzoeken of daaronder een stof te vinden zou zijn die voldoet aan de in Hoofdstuk I geformuleerde eisen.

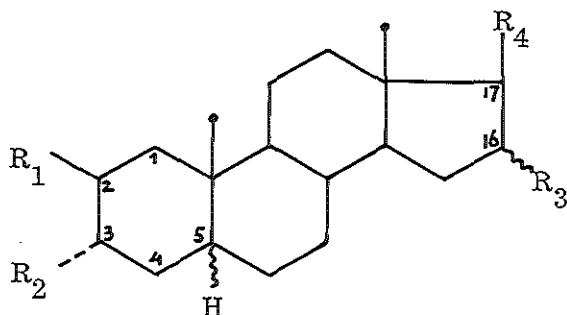
Alvorens tot synthese van gekwaterniseerde conessine-derivaten werd besloten, is in tijdschrift- en octrooïliteratuur nagegaan of het project octrooieringskansen bood. Dit bleek het geval te zijn, ofschoon toen nog niet bekend was, dat de firma Glaxo ook op dit gebied werkzaam was. Dit werd pas duidelijk uit een publikatie van Busfield et al. in 1968 (1).

Het volgende overzicht van gepubliceerde gekwaterniseerde N-houdende steroiden met eindplaatremmende werking is bijgewerkt tot 1970.

(1) Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G.,
 Brit.J.Pharmacol., 32 (1968), 609.

1. Tijdschriftliteratuur

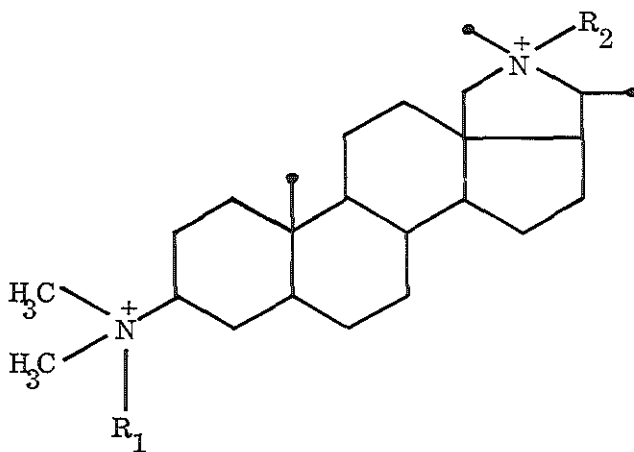
1.1. Steroiden van de algemene formule:



Literatuur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	stereochemische configuratie
Lewis (1)		OCOCH ₃	H	=O	5 α
"	(CH ₃) ₃ N ⁺	OCOCH ₃	H	=O	5 α
"	(CH ₃) ₃ N ⁺	OH	α -CH ₃	COCH ₃	5 α
"		OH	H	COCH ₃	5 α
"		OCOCH ₃	H	COCH ₃	5 α
"		OCOCH ₃	H	=O	5 α
Buckett (2)		OCOCH ₃	β	OCOCH ₃	5 α (pancuronium)
Lewis (1)	OCOCH ₃		H	OCOCH ₃	5 α
"	OCOCH ₃		H	=O	5 α , 3 β , 20 α
Khuong (3)	H	(CH ₃) ₃ N ⁺	H	-CHCH ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	5 α { 3 α , 20 α 3 β , 20 β 3 α , 20 β
Bamford (4)	H		H		alle stereoisomere combinaties op 3, 5 en 17
Busfield (5)	H	(CH ₃) ₃ N ⁺	H	-CHCH ₃ (CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	Δ^5
Blanpin (6)	H	(CH ₃) ₃ N ⁺	H	COCH ₃	5 α
"	H	(CH ₃) ₃ N ⁺	H	-CHOHCH ₃	5 α

- (1) Lewis, J.J., Martin-Smith, M., Muir, T.C. & Ross, H.H., *J.Pharm.Pharmacol.*, **19**, (1967), 502.
 (2) Buckett, W.R., Hewett, C.L. & Savage, D.S., *Chim.Ther.*, **2** (1967), 186.
 (3) Khuong, F. & Pinto-Scognamiglio, W., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, **147** (1964), 209.
 (4) Bamford, D.G., Biggs, D.F., Davis, M. & Parnell, E.W., *Brit.J.Pharmacol.*, **30** (1967), 194.
 (5) Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G., *Brit.J.Pharmacol.*, **32** (1968), 609.
 (6) Blanpin, O. & Bretandeu, J., *Soc.Biol.Poitiers*, (1961), 878.

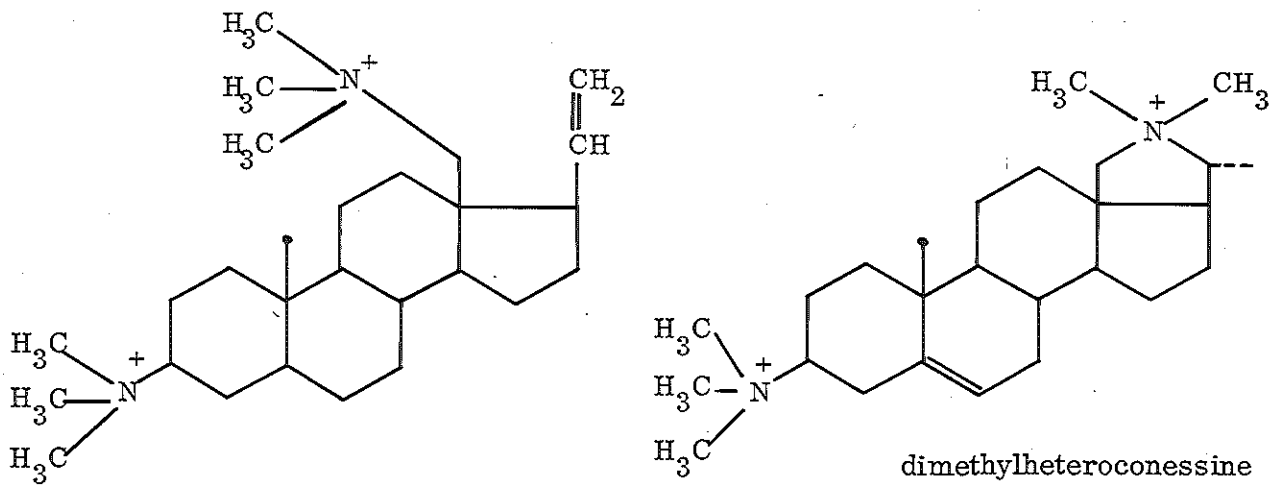
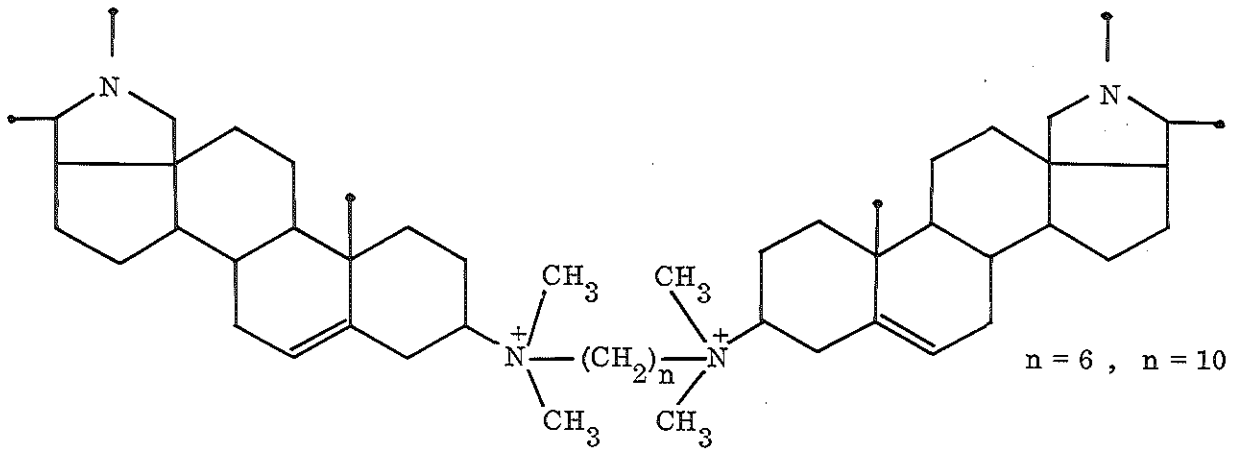
1.2. Steroiden van de algemene formule:



Literatuur	R ₁	R ₂	andere variaties
Busfield (1)	CH ₃ , C ₂ H ₅ , C ₄ H ₉ , CH ₂ Cl, CH ₂ COOC ₂ H ₅ , CH ₂ C ₆ H ₅ , CH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₅ , =O	-	Δ ⁵
	R ₁ = R ₂ = C ₂ H ₅ , C ₃ H ₇ , CH ₂ =CHCH ₂ , CH ₂ C≡CH, CH ₂ CH=CHCH ₃ , CH ₂ COOC ₂ H ₅ , CH ₂ CH ₂ OCH ₃ , CH ₂ C ₆ H ₅		Δ ⁵
	CH ₃	CH ₃	- Δ ^{4,6} 5,6α-epoxy 5,6β-epoxy 6-keto 5,6-di-OH 6α-OH 5α-OCOCH ₃ , Δ ⁶ 5-OH, Δ ⁶ Δ ⁵
	CH ₃	H	5-OH, Δ ⁶
	CH ₃	H	Δ ^{N,20}
	H	H	Δ ^{N,20}
	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	-
	H, i-C ₃ H ₇ , n-C ₄ H ₉ , n-C ₈ H ₁₇ , CH ₂ Cl, CH ₃ O, C ₆ H ₅ CH ₂ , C ₆ H ₅ OCH ₂ CH ₂	CH ₃	-
	CH ₂ OCH ₃	H	-

(1) Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G., Brit.J. Pharma-
col., 32 (1968), 609.

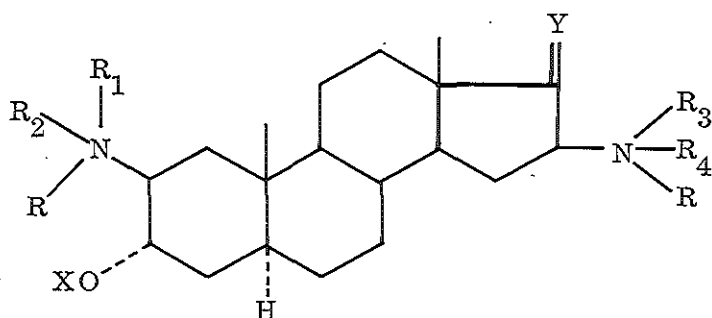
Busfield et al. synthetiseerden bovendien nog:



2. Octrooiliteratuur

Een deel van de in de tijdschriften gevonden structuren zal uiteraard terug te vinden zijn in de octrooiliteratuur. Men zal daar echter ook andere aantreffen. Het is niet altijd even duidelijk of een in een octrooi vermelde verbinding ook werkelijk een stof is met een remmende werking op de neuromusculaire overdracht. De hierna beschreven verbindingen zijn dan ook schematisch weergegeven in die zin, dat van elke R vermeld wordt, welke groepen ervoor geclaimd zijn, maar niet exact welke combinaties wanneer meer dan één R in de algemene formule voorkomt.

2.1. Structuren van de algemene formule:

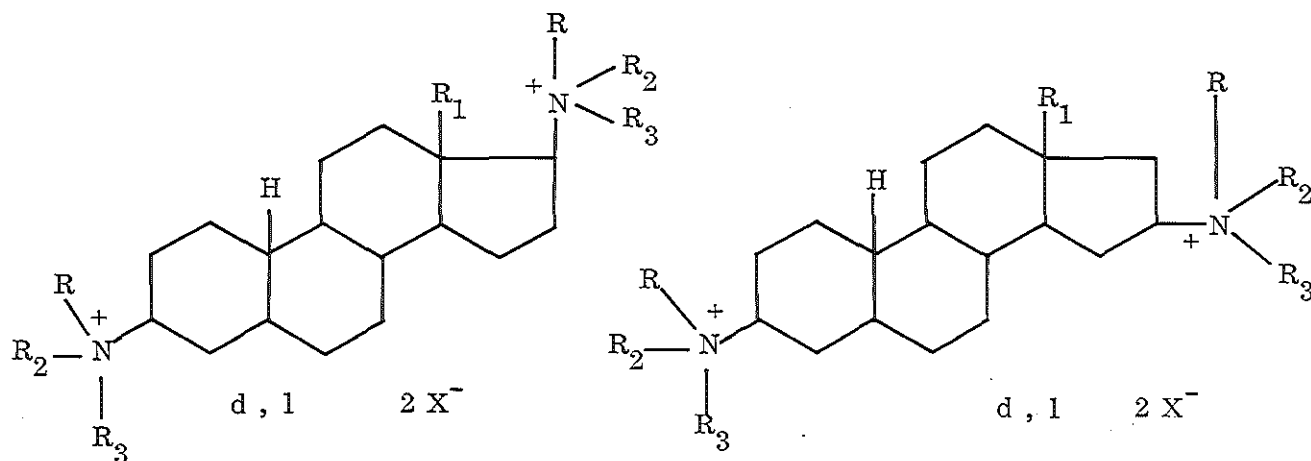


Organon Labs Ltd. (1)

- $R_1, R_2 = (\text{CH}_2)_5 ; (\text{CH}_2)_4 ; (\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2 ; \text{CH}_3, \text{CH}_3 ; \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_2\text{H}_5 ;$
 $\text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_3\text{H}_7 ; i\text{-C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_3\text{H}_7 ; \text{C}_4\text{H}_9, \text{C}_4\text{H}_9 ; 3'\text{-azabicyclo}[3',2',2']\text{-nonano}$
- $R_3, R_4 = (\text{CH}_2)_5 ; (\text{CH}_2)_4 ; (\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O} ; \text{CH}_3, \text{CH}_3 ; \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_2\text{H}_5 ;$
 $\text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_3\text{H}_7 ; i\text{-C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_3\text{H}_7 ; \text{C}_4\text{H}_9, \text{C}_4\text{H}_9 ; 3'\text{-azabicyclo}-[3',2',2']\text{-nonano}$
- $R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
- $X = \text{H}, \text{COCH}_3, \text{COCH}_2\text{CH}_3, \text{COC}_6\text{H}_5, \text{COCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
- $Y = \alpha\text{- of } \beta\text{-OH} ; =\text{O} ; \alpha\text{- of } \beta\text{-OCOCH}_3 ; \alpha\text{- of } \beta\text{-OCOCH}_2\text{CH}_3 ;$
 $\alpha\text{- of } \beta\text{-OCOC}_6\text{H}_5 ; \alpha\text{- of } \beta\text{-OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
- $\text{anion} = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{J}^-, \text{OH}^-, \text{NO}_3^-$

(1) Organon Labs Ltd., Eire 182/66, Derwent basis no. 20.916, publ. 21.2.1966.

2.2. Structuren van de algemene formules:



American Home Products Co (1)

R = CH₃; C₂H₅; C₄H₉

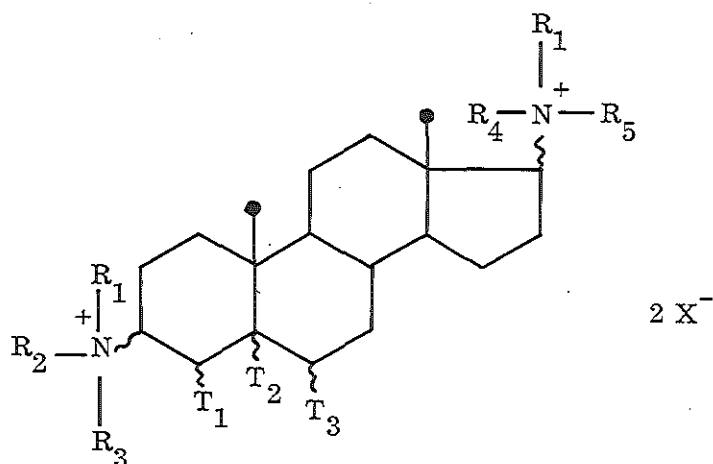
R₁ = CH₃; C₂H₅; C₃H₇

R₁, R₂ = (CH₂)₄; (CH₂)₅; (CH₂)₂O(CH₂)₂; CH₃, CH₃; C₂H₅; C₂H₅

X⁻ = Cl⁻, Br⁻, J⁻, OH⁻

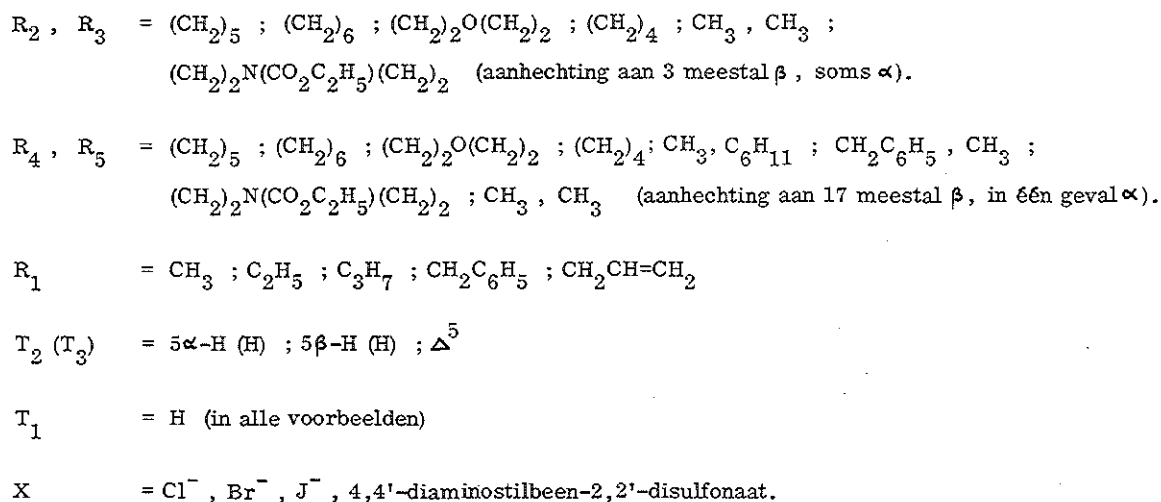
Alleen de 5 α wordt beschreven; de 5 β wordt "meegeclaimd".

2.3. Structuren van de algemene formule:



May & Baker (2)

- (1) Teller, D.M., Douglas, C.H. & Smith, H., U.S. 3.516.990, pat. 23.6.1970.
 (2) May & Baker Ltd., M. Davis Br. 1.003.681, publ. 8.9.1965.



Uit het bovenstaande overzicht is duidelijk, dat Busfield et al. ook conessine-derivaten hebben bereid, de meeste biskwaternair, sommige monokwaternair, de laatste òf wel op de 3-plaats, òf wel in de pyrrolidinering. Alle drie typen zijn werkzaam.

Het conessine zelf wordt gewonnen uit de bast van *Holarrhena antidysenterica*, een struik, die groeit in India en Centraal Afrika.

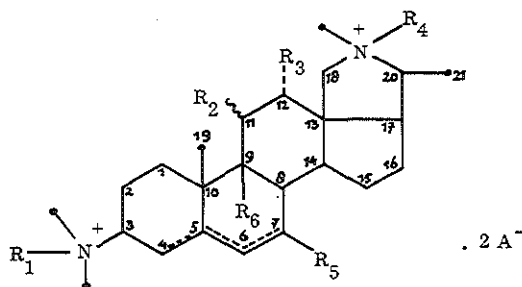
Extracten uit de bast van deze struik zijn in India lang in gebruik geweest als therapeuticum tegen amoebendysenterie. Wegens te veel ongewenste bijwerkingen is de stof echter vrijwel geheel in onbruik geraakt.

Farmacologisch zijn het conessine en een aantal derivaten ervan onderzocht door Polstorff en Schirmer (1), Burn (2), Bertho (3), Stephenson en Dutta (4), Stephenson (5), Pluchon en Pille (6) en, zoals gezegd, gekwaterniseerde derivaten door Busfield et al. (7).

-
- (1) Polstorff, K. & Schirmer, P., *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 19 (1866), 78.
 - (2) Burn, J.H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6 (1914/1915), 305.
 - (3) Bertho, A., *Ann. Chem. Pharm.*, 555 (1944), 214.
 - (4) Stephenson, R.P. & Dutta, N.K., *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948), 326.
 - (5) Stephenson, R.P., *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948), 237.
 - (6) Pluchon, J.P. & Pille, G., *Ann. Pharm. Fr.*, 8 (1950), nr. 1, 741.
 - (7) Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G., *Brit. J. Pharmacol.*, 32 (1968), 609.

De door De Flines en Marx bereide gekwaterniseerde derivaten zijn in onderstaand overzicht samengevat. Hiervan zijn Myc 1028, 1045, 1046, 1047, 1080, 1081 en 1082 monokwaternair op 3. Vermeldenswaard is nog, dat voor het invoeren van OH-groepen waar nodig gebruik is gemaakt van microorganismen (1,2).

OVERZICHT VAN DE ONDERZOCHE CONESSINE-DERIVATEN



preparaat	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Δ	A
Myc 1001	CH ₃	H	H	CH ₃	H	H	5	J ⁻
Myc 1003	CH ₃	H	H	CH ₃	H	H	4,6	J ⁻
Myc 1005	CH ₃	H	H	CH ₃	β-OH	H	5	J ⁻
Myc 1007	CH ₃	H	H	CH ₃	α-OH	H	5	J ⁻
Myc 1009	CH ₃	α-OH	H	CH ₃	H	H	5	J ⁻
Myc 1013	CH ₃	H	H	CH ₃	H	α-OH	5	J ⁻
Myc 1015	CH ₃	H	α-OH	CH ₃	H	H	5	J ⁻
Myc 1021	C ₂ H ₅	α-OH	H	C ₂ H ₅	H	H	5	J ⁻
Myc 1022	C ₂ H ₅	α-OH	H	H	H	H	5	J ⁻
Myc 1027	C ₂ H ₅	H	H	C ₂ H ₅	H	H	5	J ⁻
Myc 1028	C ₂ H ₅	H	H	H	H	H	5	J ⁻
Myc 1043	CH ₂ CH=CH ₂	H	H	CH ₂ =CHCH ₂	H	H	5	Br ⁻
Myc 1045	CH ₂ CH=CH ₂	H	H	H	H	H	5	Br ⁻
Myc 1046	C ₆ H ₅ CH ₂	H	H	H	H	H	5	Br ⁻
Myc 1047		H	H	H	H	H	5	Br ⁻
Myc 1048	C ₆ H ₅ CH ₂	H	H	C ₆ H ₅ CH ₂	H	H	5	Br ⁻
Myc 1080	C ₂ H ₅	H	H	H	H	H	4,6	J ⁻
Myc 1081	C ₂ H ₅	α-OH	H	H	H	H	5	J ⁻
Myc 1082	C ₂ H ₅ OOCCH ₂	H	H	H	H	H	5	Br ⁻
Myc 1083	C ₂ H ₅	H	H	C ₂ H ₅	H	H	4,6	J ⁻

(1) Marx, A.F., V.d. Waard, W.F. & De Flines, J., Steroids 8 (1966), 391.

(2) Marx, A.F., V.d. Waard, W.F. & De Flines, J., Steroids 8 (1966), 421.

HOOFDSTUK V

PRIMAIRE SCREENING

1. Keuze van de methode

De hoeveelheid stof die uiteindelijk voor het farmacologisch onderzoek ter beschikking komt, is o.a. afhankelijk van de niet altijd voorspelbare opbrengsten van elke synthese-stap, zodat niet met elke verbinding alles onderzocht kan worden en het onderzoek niet altijd zo grondig kan zijn als men wel zou willen. Een primaire screening moet daarom met de kleinst mogelijke hoeveelheid stof een maximum aan informatie opleveren, zeker over de hoofdwerking, liefst ook over een aantal bijwerkingen. Daar de keuze van de proefdieren naar aantal en gewicht soms beperkt wordt door de hoeveelheid beschikbare stof, moet men in zulke gevallen aan de betrouwbaarheid van de uitkomsten enige concessies doen.

Bij de primaire screening van motorische-eindplaatremmers heeft men de keuze uit een aantal geïsoleerde-orgaan-technieken, zoals het N-phrenicus-diafragma-preparaat van de rat, het M-biventer-cervicis-preparaat van het kuiken, de M.rectus abdominis van de kikker, en een aantal proeven met intacte dieren, zoals de "head drop" bij het konijn, de paralyse van de ademhalingsspieren bij de muis, het N-peronaeus-M-tibialis-preparaat bij de kat of de hond.

Wij kozen het laatste. Dit heeft het nadeel, dat met betrekkelijk grote dieren wordt gewerkt, dus veel stof verbruikt wordt, maar de voordelen zijn evident: men bepaalt op eenvoudige wijze de hoofdwerking en de intensiteit ervan, men krijgt een eerste indruk van de inwerkingssnelheid, van het werkingstype en van de eliminatiesnelheid in vivo, terwijl men bovendien gegevens verkrijgt over de invloed op de hartwerking (ECG, frequentie en bloeddruk) en zo men wil nog op andere parameters, zoals het ganglion cervicale superius.

De grotere hoeveelheid voorlopige informatie moet evenwel betaald worden met een geringere betrouwbaarheid van de uitkomsten. Vaak kon de proef slechts op één dier worden gedaan. Toch blijkt op deze wijze bij vergelijking van een reeks verbindingen met goed gestandaardiseerde proefopstellingen het maken van een voorlopige keuze volgens tevoren gestelde criteria redelijk goed mogelijk te zijn. De juistheid van de keuze moet worden getoetst aan nadere bepalingen, nadat meer stof is bijgemaakt.

2. Keuze van het proefdier

De eerste serie proeven met submaximale tot maximale doseringen werd verricht bij de kat, omdat deze lichter is dan de hond en voor deze proeven algemeen wordt gebruikt. Voor supramaximale doseringen viel de keus evenwel op de hond, en wel om twee redenen:

- 2.1. het hondehart lijkt sterk op dat van de mens, zowel morfologisch als wat betreft het verloop van het excitatiefront, en tengevolge daarvan het ECG. Men dient evenwel te bedenken, dat het hondehart bij hypoxie of onder invloed van bepaalde

stoffen eerder repolarisatiestoornissen vertoont dan het mensenhart (ST-T-depressies).

- 2.2. Khuong en Pinto-Scognamiglio (1) onderzochten eveneens bij de hond het malouétine (3β - 20α -bistrimethylammonium- 5α -pregneen), een met onze verbindingen nauw verwante stof. Zij vonden ongewenste bijwerkingen op bloeddruk en ECG en keurden op grond daarvan de stof af voor verdere evaluatie.

De verbindingen, die op grond van de screening bij de hond werden geselecteerd, werden opnieuw bij de kat onderzocht in dezelfde proefopstelling, maar nu met eveneens supramaximale doseringen.

3. Methode

3.1. Proefdier: kat of hond.

3.2. Anesthesie: pentobarbital, ongeveer 0,7 ml/kg intraperitoneaal, of thiopental, ongeveer 1 ml/kg i.p. en tijdens de proef intraveneus bijspuiten voor zover nodig.

De dieren werden na intubatie beademd met een mengsel van lachgas/zuurstof in de verhouding 7 : 3. Het ademvolumen werd tevoren bepaald aan het spontaan ademende dier met de Wright-respirometer. Op geleide van deze respirometer werd dit ademvolumen tijdens de ademparyse gehandhaafd. De kunstmatige beademing van de hond geschiedde met een apparaat, dat positieve drukfasen afwisselt met negatieve, m.a.w. zowel de in- als de uitademing actief verzorgt (Pulmomat, Drägerwerk). Katten (en ook andere kleine dieren, zoals apen) werden beademd met de Keuskamp-kinderrespirator, eveneens met een positieve en een negatieve drukfase. Tijdens de herstelfasen tussen twee doseringen van de te onderzoeken stoffen werd op geleide van voornamelijk nociceptieve reflexen geregeld gecontroleerd of de anesthesie nog diep genoeg was. Later werd gedurende de hele proef de anesthesie geregeld op geleide van het EEG: langzame, lage potentialen werden beschouwd als indicatie voor een voldoende diepe anesthesie. Bij het optreden van snellere frequenties en hogere potentialen werd het anestheticum bijgespoten.

Om interferenties met de werkingen van andere stoffen zoveel mogelijk te vermijden, werd geen premedicatie met atropine gegeven.

3.3 Proefopstelling: Nadat het dier op het kunstmatige-ademhalingstoestel was aangesloten, werd de N. peroneus vrijgeprepareerd en een bipolaire Pt-elektrode erop aangebracht. Deze was verbonden met een Grass-stimulator. De zenuw werd niet doorgesneden tussen ruggemerg en prikkelelektrode. De zin van het doorsnijden zou zijn irradiatie van het effect via het centrale zenuwstelsel te voorkomen. Uit hierop gerichte proeven met intacte zenuwen bleek hiervan echter niets. Met een snel lopende recorder en enkelvoudige indirecte prikkeling werd steeds slechts een enkele spiercontractie geregistreerd, terwijl met faradische prikkeling van lage frequentie in de geschreven clonus nooit meer pieken waren te onderscheiden dan prikkels toegediend op de zenuw. Mogelijk wordt irradiatie via het CZS door de anesthesie geremd.

De distale pees van de M. tibialis anterior werd eveneens vrijgeprepareerd, doorgesneden en via een katrolletje verbonden met de ijzeren kern van een verticaal

(1) Khuong, F. & Pinto-Scognamiglio, W., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 147 (1964), 209.

opgestelde verplaatsingsopnemer. De andere kant van de ijzeren kern was verbonden met een lange, slappe spiraalveer. De poot werd stevig gefixeerd. Op deze wijze werd bereikt, dat de contracties vrijwel isotoon en zonder schokken verliepen.

Naaldelektrodes werden subcutaan ingebracht op vier plaatsen om de afleidingen I, II en III van het ECG te kunnen registreren.

In een A. carotis werd een canule gebracht, die, gevuld met heparineoplossing, was verbonden met een drukopnemer ter registratie van de bloeddruk.

Als polygraaf werd aanvankelijk een ultravioletrecorder, later een direct-schrijvende penschrijver (Hellige) gebruikt.

- 3.4. Prikkel: De zenuw werd geprikkeld met enkelvoudige supramaximale rechthoekige prikkels met een duur van 0,4 msec en een frequentie van 4 per minuut. In enkele voorproefjes bleek het, naar verwacht mocht worden, geen verschil te maken of men enkelvoudig dan wel faradisch prikkelt. Het voordeel van faradisch prikkelen is dat grotere contractiehoogten worden verkregen; het mogelijke nadeel, dat de complexiteit ervan tot effecten zou kunnen leiden die de interpretatie bemoeilijken.

De dosis-werkingscurven van gallamine in sub- en supramaximale doseringen bij de kat waren identiek, wanneer de zenuw geprikkeld werd met resp. een enkelvoudige rechthoekige prikkel van 300 μ sec, een pulshoogte van 500 mV, elke 15 sec gegeven, en een faradische prikkel van 300 μ sec, een pulshoogte van eveneens 500 mV in treintjes van 20 pulsen met een frequentie van 100 Hz, wederom elke 15 sec gegeven. Het ligt voor de hand, dat de kracht van de contractie na een faradische prikkel groter is dan na een enkelvoudige, maar omdat de spier isotoon en praktisch onbelast werkte, speelde dit geen enkele rol.

De stoffen, opgelost in fysiologisch zout, werden snel geïnjecteerd via een canule in een V. femoralis.

4. Referentiestoffen

Als referentiestoffen werden gebruikt gallamine of alcuronium. Van d-tubocurarine is wel een aantal dosis-werkingscurven bepaald ter algemene vergelijking, maar deze stof is langwerkend. Dat maakt de wachttijden tussen de opeenvolgende doseringen onpraktisch lang.

Ook met succinylcholine is een aantal proeven gedaan. Deze stof is echter van een ander werkingstype en daarom niet als vaste referentiestof gebruikt.

Toen pancuronium beschikbaar kwam, werd hiermee achteraf nog een aantal proeven gedaan, die evenwel reeds in dit hoofdstuk worden beschreven.

5. Parameters

5.1. Latente tijd (TL₉₀)

In Hoofdstuk I werd bij de formulering van de eisen, waaraan een verbeterd perifeer werkend spierrelaxans zou moeten voldoen, verklaard, dat zo'n verbinding zeer snel een complete paralyse moet teweegbrengen om intubatie mogelijk te maken. Om op deze parameter tot een enigszins betrouwbare vergelijking van de verschillende te onderzoeken stoffen te komen, werd besloten steeds bij dezelfde dosering, nl. de RD₉₀ (5.2.), het tijdsverloop te meten tussen het moment van

inspuiten en het moment waarop juist de maximale relaxatie werd bereikt. Deze tijd werd de latente tijd genoemd (TL_{90}).

De gevonden waarden zijn enigszins onnauwkeurig doordat de prikkels 4 maal per minuut werden toegediend, zodat bij het aflezen zowel van het moment van injectie als van het moment van bereiken van maximale paralyse een fout van ten hoogste 15 seconden werd gemaakt, terwijl bovendien de RD_{90} met bijbehorende TL_{90} veelal door interpolatie moest worden verkregen. Een meer betrouwbare, in elk geval een meer directe parameter zou zijn, in de dierproef vast te stellen hoe snel na de injectie intubatie mogelijk is. Bij de gebruikelijke proefdieren (kat, hond, aap) bestaan geen intubatieproblemen zoals die bij de mens voorkomen. De intubatie verloopt, zelfs bij niet volledige paralyse, vrijwel moeiteloos.

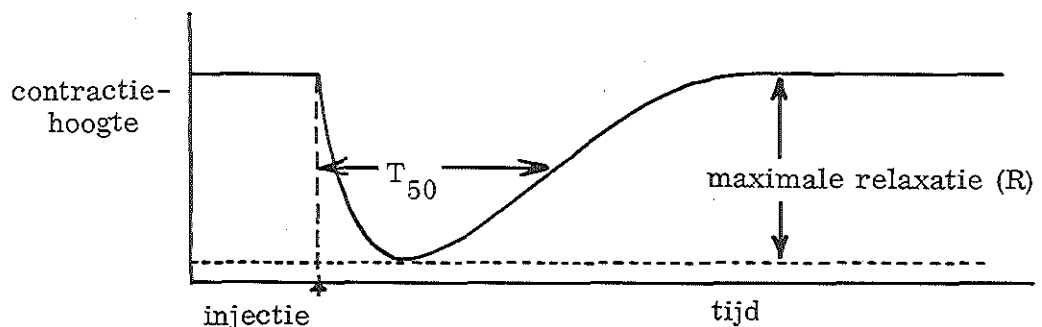
5.2. RD_{90}

Uit de betrekking tussen dosis en relaxatie kan RD_x worden berekend, d.i. de dosis die de contractieamplitudo met $x\%$ reduceert.

De RD_{90} is dus de dosis, die bijna volledige paralyse (i.c. 90%) teweegbrengt.

5.3. Dosis-werkingscurve

Onder werking kan worden verstaan het percentage waarmee de uitgangscontractiehoogte wordt gereduceerd, of de relaxatieduur (T_{50}), d.i. het tijdinterval tussen het moment van injectie en het moment, waarop 50% van het maximaal bereikte effect (R) weer is verdwenen.



Van het meeste belang is het de T_{50} te bepalen als functie van de dosis, omdat gezocht moet worden naar een kortwerkende stof (Hoofdstuk I, 4.2.).

Hoe vlakker deze $T_{50} = f(D)$ curve, des te nauwkeuriger is de werkingsduur te reguleren.

Het is te verwachten, dat de ligging en de steilheid van de diverse $T_{50} = f(D)$ lijnen verschillend zullen zijn. Om tot een gemakkelijker vergelijking te komen, kunnen enkele kunstgrepen worden toegepast.

Door in het submaximale dosisgebied de T_{50} als functie van R te tekenen ($T_{50} = g(R)$), bereikt men, dat punten van gelijke relaxatie op de abscis op dezelfde plaats komen, zodat vergelijking van de T_{50} -waarden en van de steilheid van de lijnen in één oogopslag mogelijk is.

In het supramaximale dosisgebied is de relaxatie steeds 100%. Daar gaat deze omzetting niet op. Drukt men echter in $T_{50} = f(D)$ D uit in RD_{90} -eenheden, dan bereikt men dat doseringen die relatief even ver in het supramaximale gebied liggen, eveneens op dezelfde plaats op de abscis gevonden worden, waardoor wederom T_{50} en steilheid eenvoudig met elkaar kunnen worden vergeleken.

5.4. Relatie TL₉₀-T₅₀

Omdat voor succinylcholine een korte TL₉₀ gepaard gaat aan een korte werkdur, werd nagegaan hoe de correlatie is tussen TL₉₀ en T₅₀ behorende bij RD₉₀.

Naast deze op spierrelaxerende werking betrekking hebbende parameters werden gelijktijdig geregistreerd:

5.5. Bloeddruk

5.6. Hartfrequentie

5.7. ECG

Tenslotte werd nog nagegaan:

5.8. de invloed van cholinesteraseremmers op het effect.

Aanvankelijk werd overwogen bij de screening nog in aanmerking te nemen het verschil in gevoeligheid tussen ademhalings- en skeletspieren, ervan uitgaande, dat in de kleine chirurgie (bv. bij het zetten van fracturen) een stof die bij skeletspier-relaxerende dosis nog geen ademparalyse teweegbrengt, een welkome aanwinst zou kunnen betekenen. Hierover hebben Paton en Zaimis (1) reeds onderzoek gedaan met decamethonium en d-tubocurarine, waaruit bleek, dat de M. tibialis anterior gevoeliger was voor decamethonium dan het diafragma. Voor d-tubocurarine gold het omgekeerde. Alderson en Maclagan (2) hebben dit fenomeen nader onderzocht en gevonden, dat deze verschillen geheel verdwijnen wanneer men er voor zorgt, dat gedurende de proef de temperatuur in de poot en in het diafragma gelijk is en de twee spieren met dezelfde frequentie worden geprikkeld. Doet men de proef zonder extra verwarming van de poot, dan is tijdens de anesthesie de temperatuur in de poot 2-3° C lager dan in de thorax. Dit betekent, dat eventueel te vinden marges tussen skelet- en ademhalings-spierverlamende doseringen kunstmatig zijn. Daarom werd van deze parameter afgezien.

6. Selectiecriteria

Stoffen welke voor verder onderzoek in aanmerking komen, dienen aan de volgende criteria te voldoen:

- 6.1. korte latente tijd (TL₉₀),
- 6.2. kleine T₅₀ tot zo hoog mogelijke, ook supramaximale, doseringen. Het is te verwachten, dat naarmate door toename van de dosis het eliminatiemechanisme meer verzadigd raakt, de T₅₀ steeds sneller zal gaan toenemen,
- 6.3. afwezige of verwaarloosbare veranderingen in de bloeddruk, de hartfrequentie en het ECG in een zo groot mogelijk dosisgebied,
- 6.4. de werking moet antagoneerbaar zijn: voor niet-depolariserende spierrelaxantia zullen cholinesteraseremmers als antagonisten in aanmerking komen.

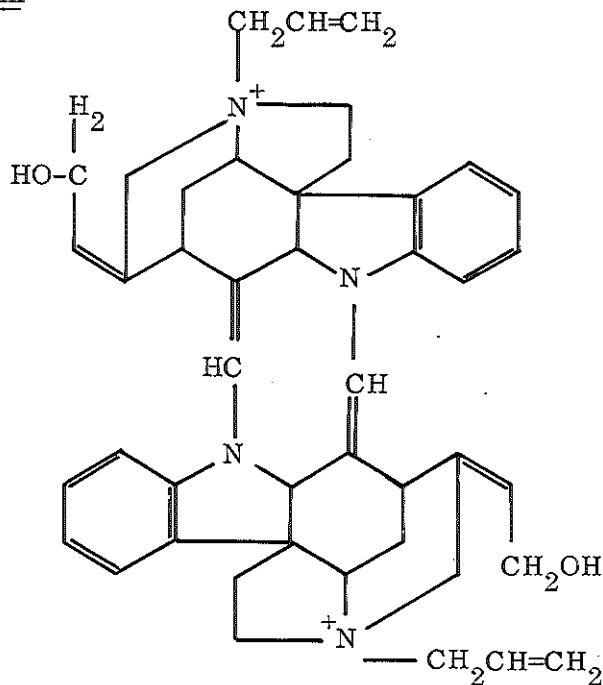
(1) Paton, W.D.M. & Zaimis, E.J., J. Physiol., 112 (1951), 311.

(2) Alderson, A.M. & Maclagan, J., J. Physiol., 173 (1964), 38.

7. Resultaten

7.1. Proeven met referentiestoffen

7.1.1. Alcuronium



7.1.1.1. Kat

Fig. 2 is het uit de oorspronkelijke curve opgemeten en grafisch weergegeven verloop van de bloeddruk en de hartfrequentie alsmede de dosis/T₅₀-curve van een representatieve proef uit een serie van vier.

In deze en volgende curven zijn steeds variaties te onderkennen, welke niet veroorzaakt worden door toediening van de eindplaatremmer, maar toe te schrijven zijn aan veroudering van het preparaat, tussentijdse toediening van het anestheticum (zie o.a. op tijdstip 14.00 u in fig. 2), variaties in de beademing en het inspuiten van de stoffen (kortdurende bloeddruk- en frequentie-effecten).

In deze en volgende curven worden uitsluitend aangeduid de momenten waarop de eindplaatremmer werd gegeven.

Alcuronium blijkt geen afwijkingen in bloeddruk en hartfrequentie of in het ECG op te leveren. De RD₉₀ ligt tussen 20 en 40 µg/kg. TL₉₀ = 4 min.

7.1.1.2. Hond

Hetzelfde beeld verkrijgt men bij de hond.

Fig. 3 is een representatieve curve uit een viertal experimenten. In de aanvang van de proef is het preparaat nog enigszins onstabiel blijkens de schommelingen in de bloeddruk. De tensie- en frequentiedalingen als gevolg van de injectie van alcuronium zijn kortdurend maar dosisafhankelijk, dus waarschijnlijk geen spuitedeffecten.

Het ECG vertoont geen afwijkingen. De dosis/T₅₀-curve loopt in het supramaximale gebied ongeveer even vlak als bij de kat. De RD₉₀ ligt tussen 10 en 20 µg/kg. Bij de hond werkt de stof ongeveer drie maal zo kort als bij de kat. TL₉₀ = 2,5 min.

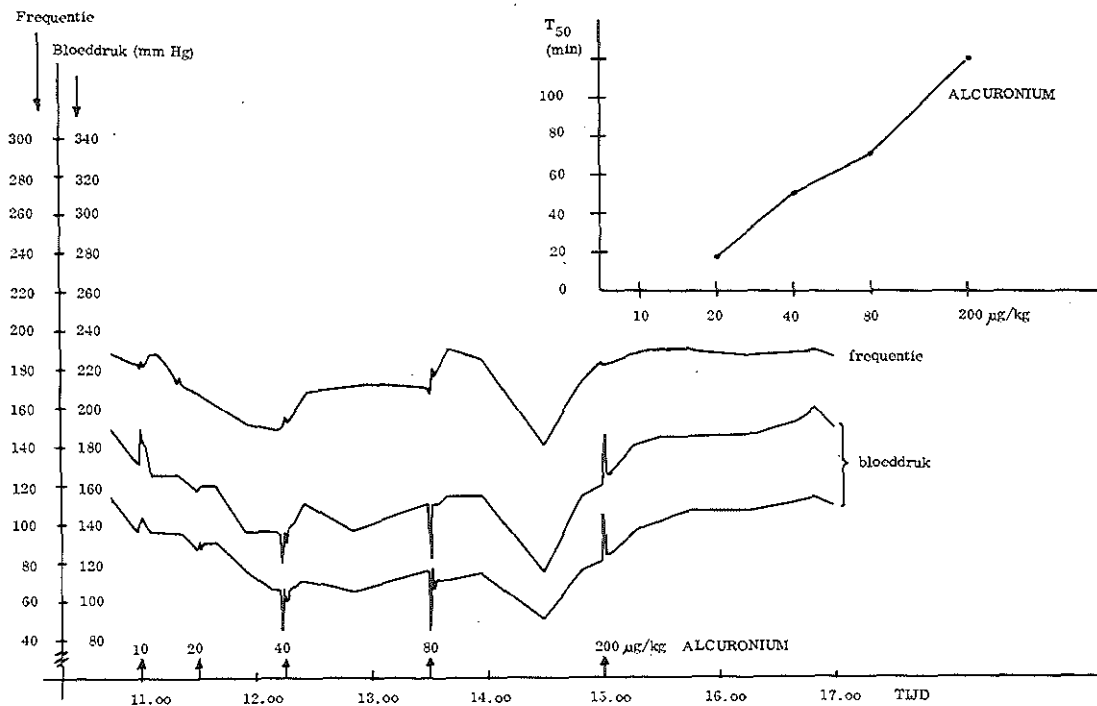


Fig. 2 - Alcuronium, kat: bloeddruk, frequentie en T₅₀

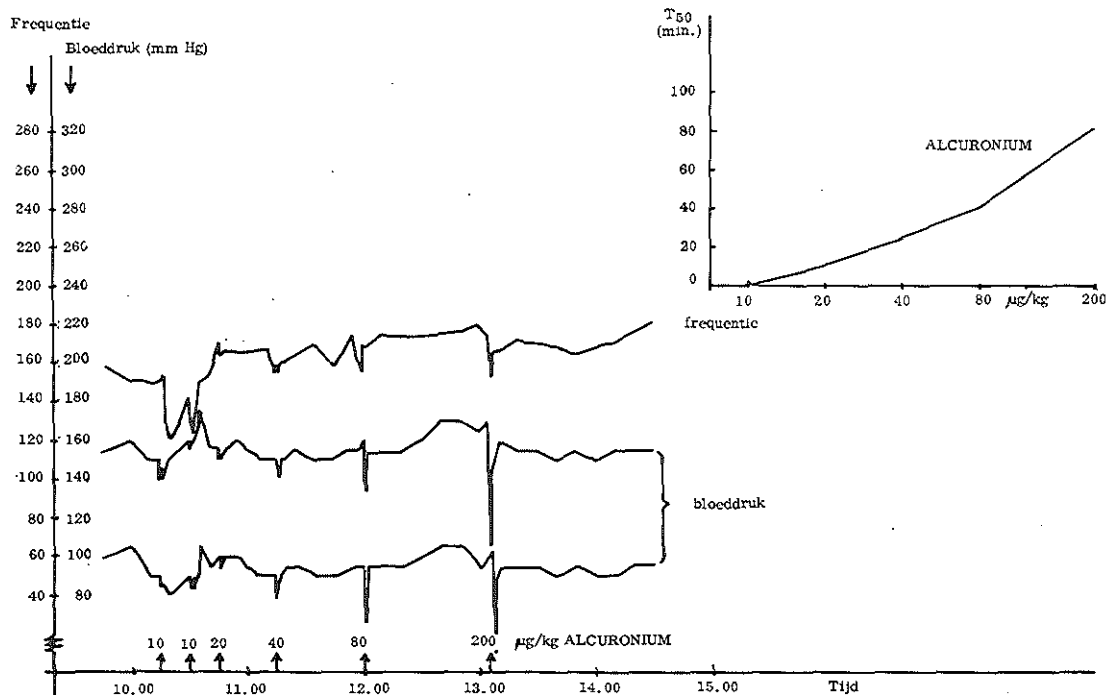


Fig. 3 - Alcuronium, hond; bloeddruk, frequentie en T₅₀

7.1.1.3. Aap

Een enkele proef bij een rhesusaap leverde een heel ander beeld. Uit fig. 4 blijkt, dat de bloeddruk bij lagere doseringen korte tijd stijgt en bij hogere doseringen daalt. De frequentie is redelijk stabiel, behalve na toediening van 40 µg/kg, waarbij de beademing tijdelijk onvoldoende was. Het ECG vertoont geen veranderingen tot 80 µg/kg. Hiermee wordt nog geen 100% relaxatie bereikt. Bij de supramaximale doseringen van 112 en 224 µg/kg werden de volgende veranderingen waargenomen: vlakke T-top in afleiding I, diep negatieve T-toppen in afleiding II.

Bij de extreem hoge dosering van 8 mg/kg ($\pm 80 \times RD_{90}$) worden de T-toppen in afleiding I ook negatief en in afleiding II worden weer diep negatieve T-toppen gezien. Het ST-segment is voor korte tijd verlaagd. De bloeddruk daalt tot zeer lage waarden. Dit alles wijst op ischemie van de hartspier.

De RD_{90} is aanzienlijk hoger en de dosis/ T_{50} -curve steiler dan die bij hond en kat.

De aap blijkt, wat de gevoeligheid zowel van zijn dwarsgestreepte spieren als van zijn hartspier betreft, te verschillen van kat en hond. Deze waarneming kon bij gebrek aan voldoende apen voor andere niet-depolariserende referentiestoffen niet worden bevestigd.

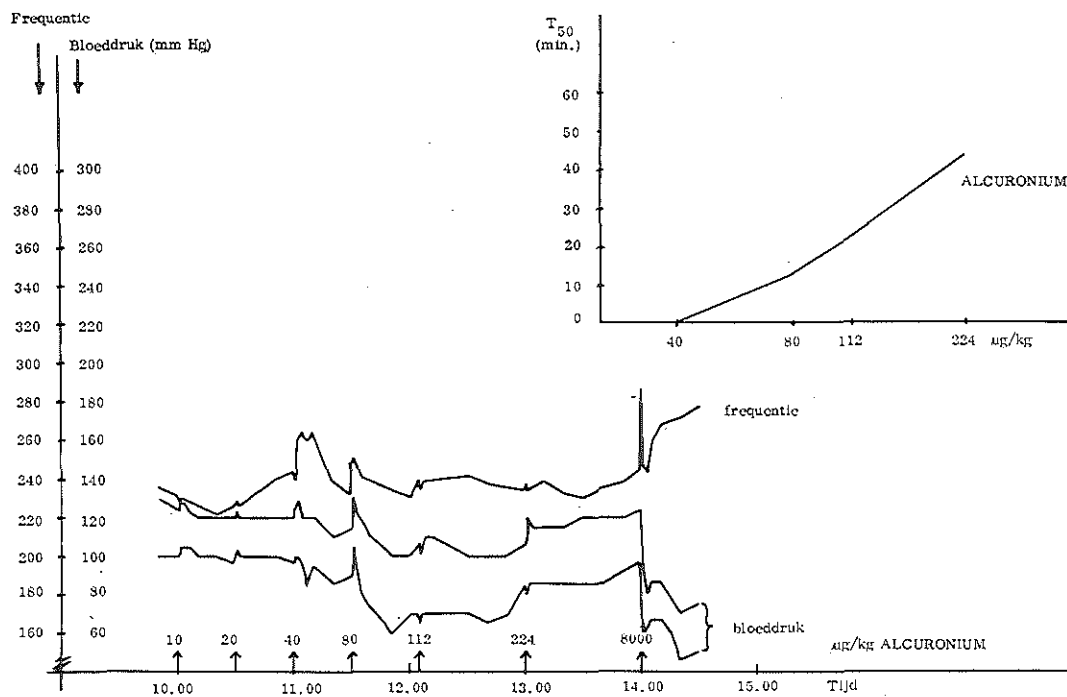
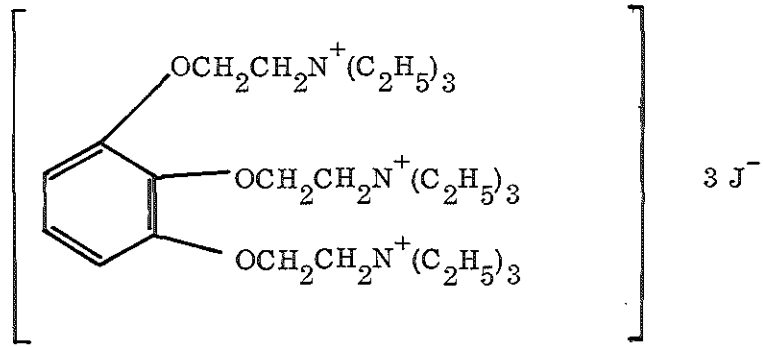


Fig. 4 - Alcuronium, aap; bloeddruk, frequentie en T_{50}

7.1.2. Gallamine



7.1.2.1. Kat

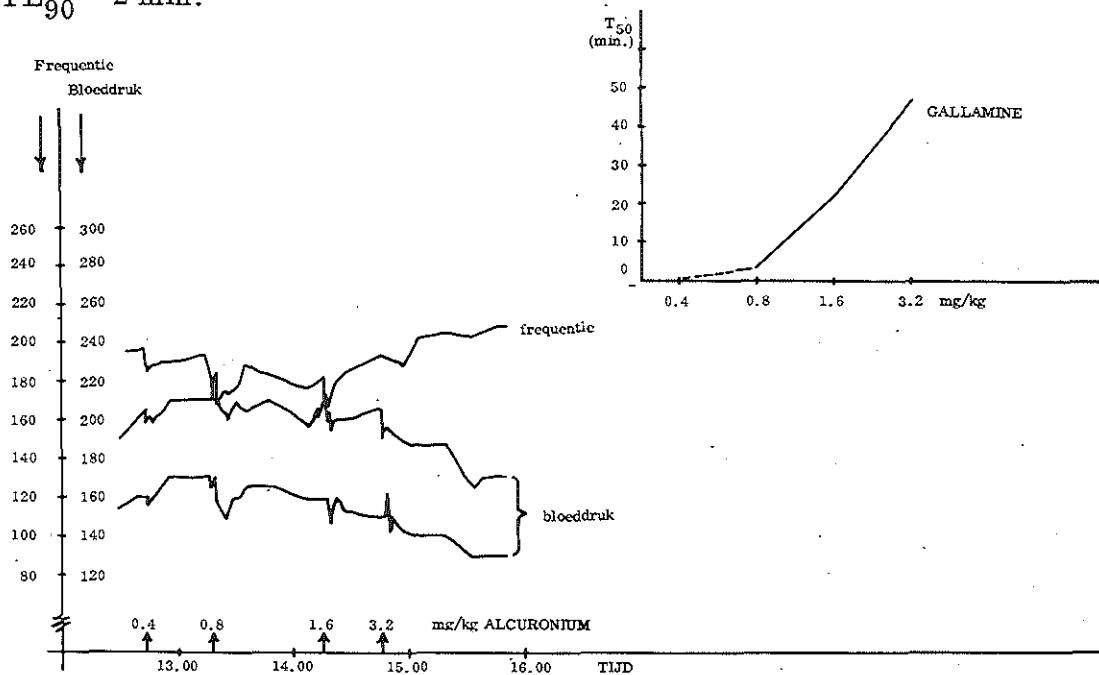
Van een viertal experimenten geeft fig. 5 een voorbeeld. De RD₉₀ is ongeveer 0,6 mg/kg. In supramaximale doseringen stijgt de T₅₀ zeer snel, vergelijkbaar met alcuronium.

De bloeddruk vertoont na elke injectie geringe dalingen, zowel systolische als diastolische.

De frequentie geeft dalingen van weinig betekenis te zien.

Gedurende de hele proef zijn in het ECG geen afwijkingen gevonden.

TL₉₀ = 2 min.

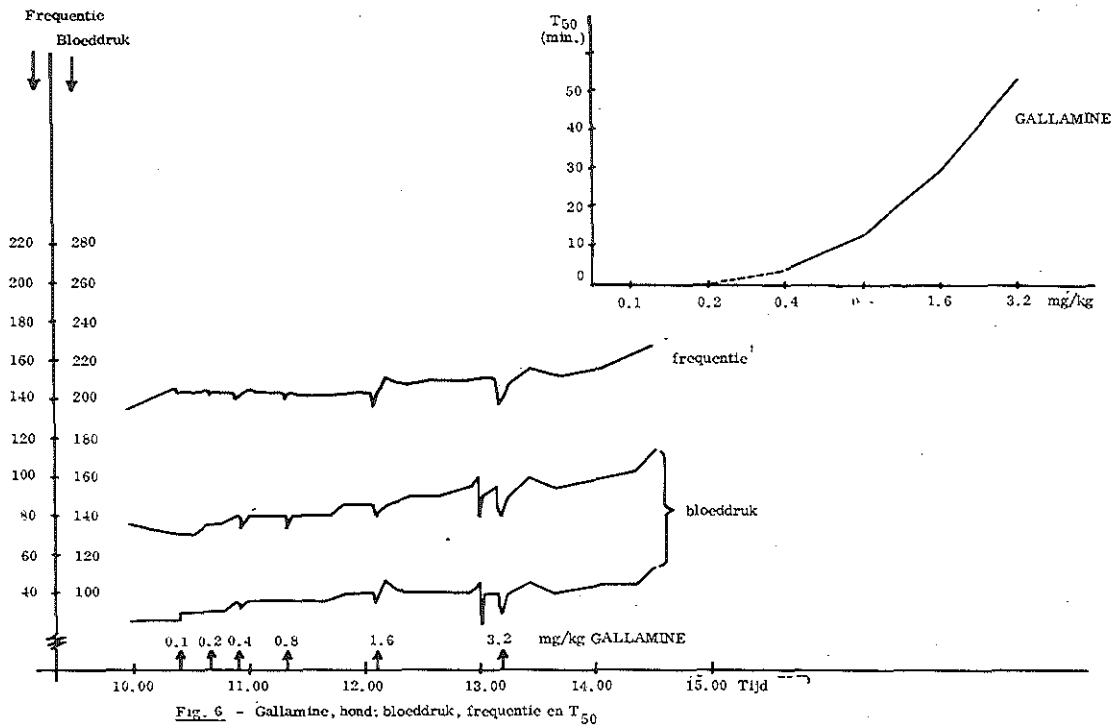


7.1.2.2. Hond

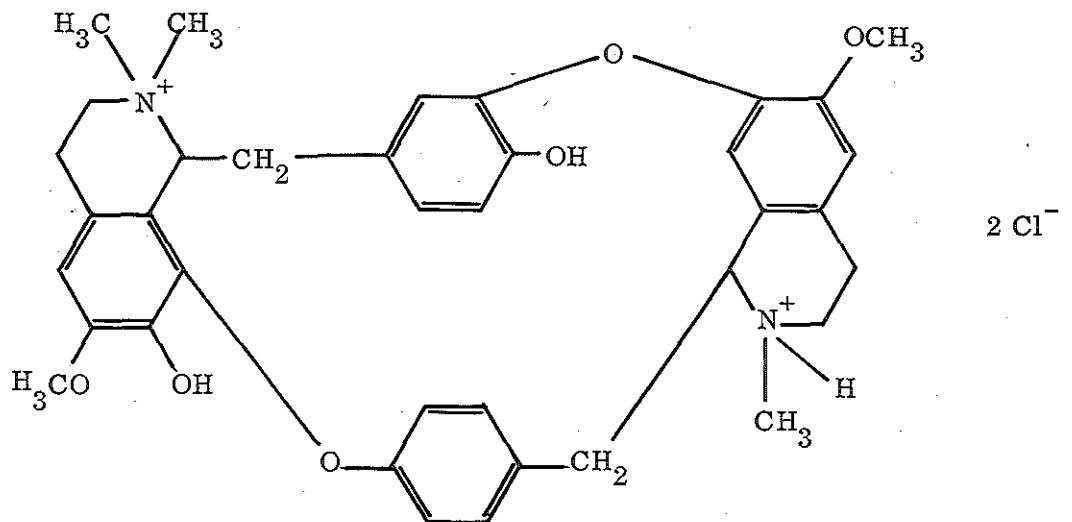
De bevindingen bij de hond worden uit een serie van vier proeven representatief weergegeven in fig. 6.

De RD₉₀ ligt ook hier in de buurt van 0,6 mg/kg. Ook bij de hond neemt de T₅₀ snel toe met de doseringen. Bloeddruk en frequentie worden pas enigermate beïnvloed bij 3,2 mg/kg. Het ECG vertoont geen afwijkingen. TL₉₀ = 2 min.

Van de 4 katten en 4 honden waarin gallamine is onderzocht, werd bij slechts één hond een tachycardie gezien, zoals die in de kliniek bekend is.



7.1.3. d-Tubocurarine *)



*) structuur monokwaternair vgl. Everett, A.J., Lowe, L.A. & Wilkinson, S., Chem. Commun., 16 (1970), 1020.

7.1.3.1. Kat

Uit fig. 7, representatief voor de resultaten uit een drietal proeven, zijn duidelijk te zien de uit de kliniek bekende sterke bloeddrukdalingen bij alle doseringen, ook reeds bij de RD_{90} , in dit experiment ongeveer 0,3 mg/kg. Dit geldt ook voor de hartfrequentie, met uitzondering van de hoogste dosis. Merkwaardigerwijze ziet men bij deze proeven nauwelijks ECG-afwijkingen, ook niet bij de hoogste dosering. Tensiedaling op zich behoeft dus niet een oorzaak voor ischemische ECG-veranderingen te zijn. Als vermindering van de perifere weerstand ten grondslag ligt aan de tensiedaling, gaat een geringere coronairdoorstroming gepaard met vermindering van de belasting van het hart en daarmee van de zuurstofbehoefte. Dit is waarschijnlijk de verklaring van de afwezigheid van ECG-afwijkingen na d-tubocurarine, omdat er vaatverwijdingen ontstaan als gevolg van ganglionblokkade, histamine-vrijmaking en uitschakelen van de spiertonus door zijn curariserende werking.

De dosis/ T_{50} -curve is steil. $TL_{90} = 4$ min.

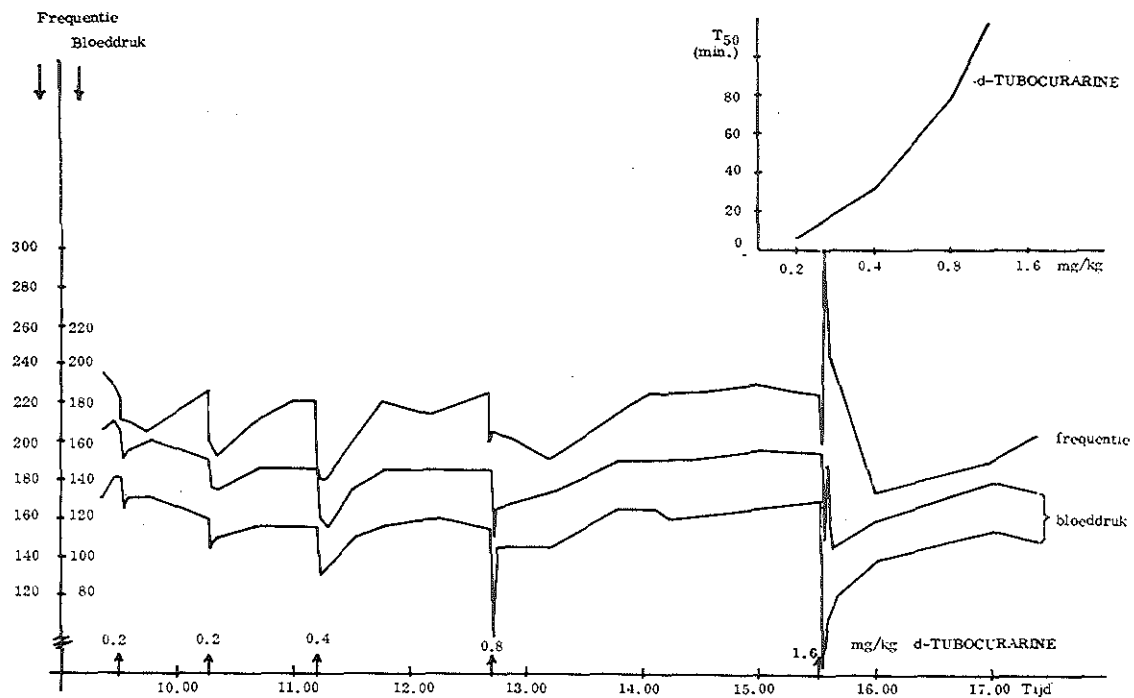


Fig. 7 - d-Tubocurarine, kat; bloeddruk, frequentie en T_{50}

7.1.3.2. Hond

Hetzelfde beeld ziet men bij de hond. Daarbij moet echter worden aangetekend, dat de frequentie, afgebeeld in fig. 8, stijgingen vertoont, terwijl zij in een analoge proef na elke stoftoediening juist daalde.

Ook hier werden zelfs tijdens de extreem sterke bloeddrukdalingen geen of slechts minimale afwijkingen in het ECG gezien.

De RD_{90} bedraagt ongeveer 0,5 mg/kg. $TL_{90} = 3$ min.

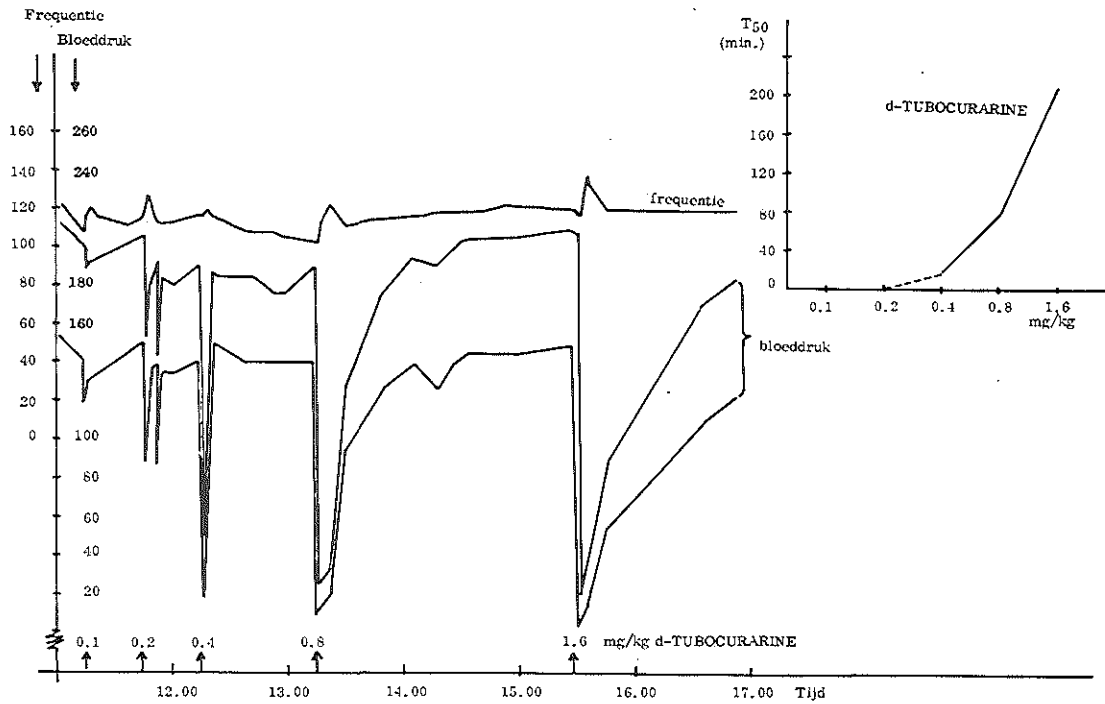
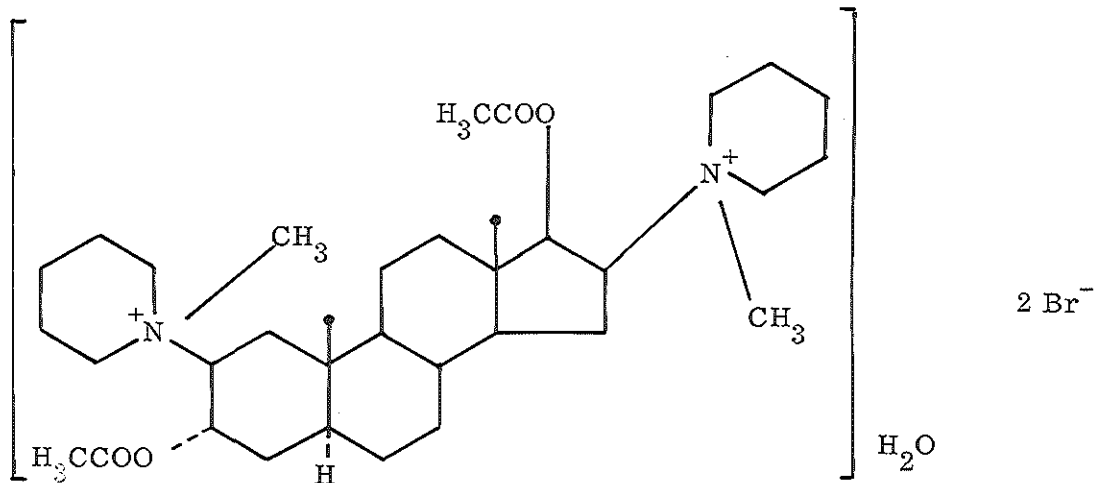


Fig. 8 - d-Tubocurarine, hond: bloeddruk, frequentie en T₅₀

7.1.4. Pancuronium



Onderstaande gegevens van pancuronium berusten slechts op een enkele proef. Toen deze stof beschikbaar kwam, was ons onderzoek reeds zover gevorderd, dat deze verbinding als referentiestof niet meer relevant was.

7.1.4.1. Kat

Uit fig. 9 blijkt, dat de bloeddruk bij alle doseringen enige stijging vertoont. Dit geldt ook voor de frequentie. De daling aan het einde van de proef wordt veroorzaakt door bijspuiten van het anestheticum.

ECG-afwijkingen worden niet gezien.

De RD₉₀ bedraagt ongeveer 40 µg/kg. De dosis/T₅₀-curve stijgt minder steil dan die van d-tubocurarine. TL₉₀ = 3 min.

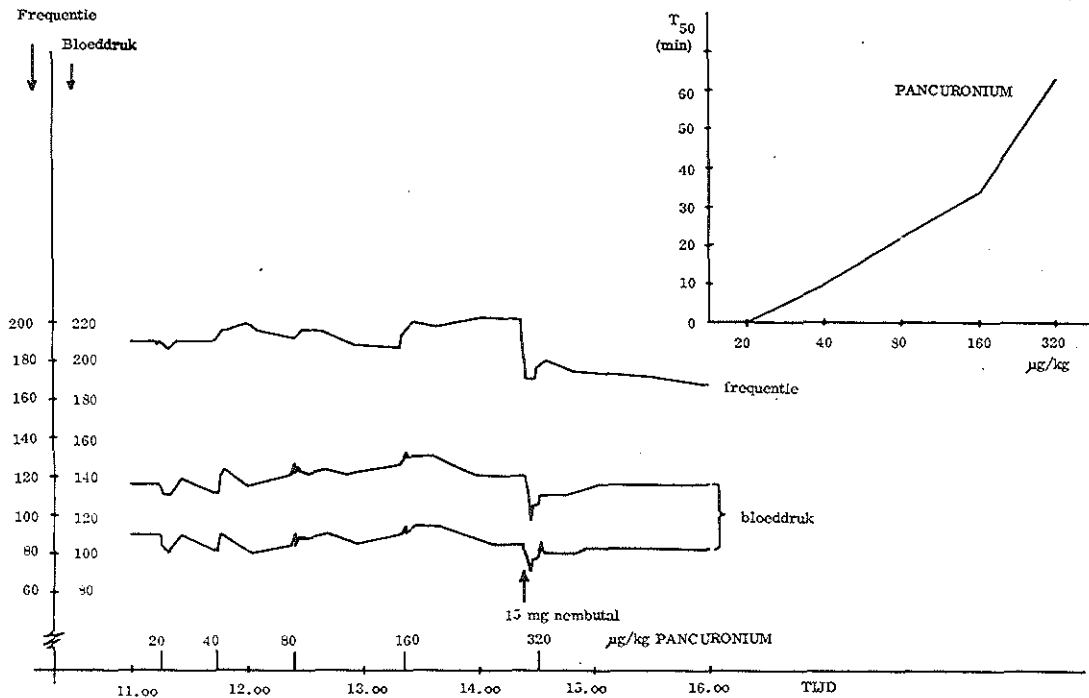


Fig. 9 - Pancuronium, kat: bloeddruk, frequentie en T₅₀

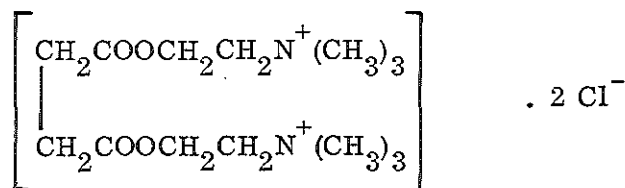
7.1.4.2. Hond

Bij de hond gedraagt zich de bloeddruk afwijkend van die bij de kat in die zin, dat bij supramaximale doseringen dosisafhankelijke dalingen optreden (fig. 10). De frequentie wordt nauwelijks beïnvloed.

Het ECG vertoont geen afwijkingen.

De dosis/T₅₀-curve is steiler dan bij de kat; de RD₉₀ bedraagt 15-20 µg/kg. TL₉₀ = 2,25 min.

7.1.5. Succinylcholine



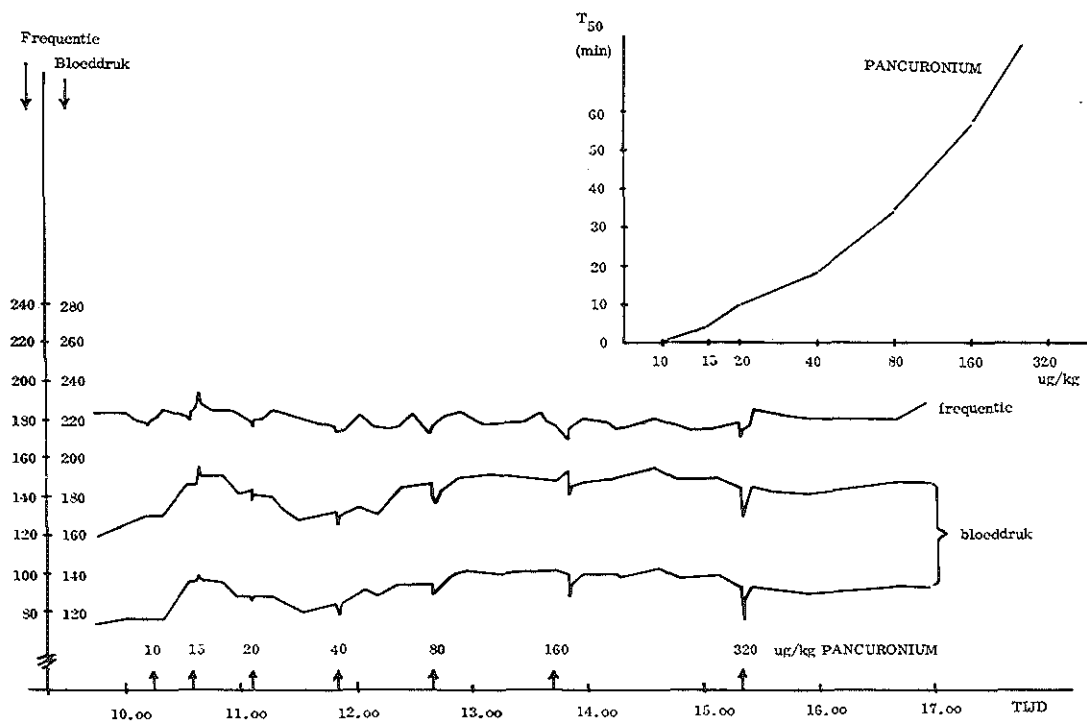


Fig. 10 - Pancuronium, hond; bloeddruk, frequentie en T_{50}

Deze stof behoort tot het depolariserende type en past dus niet in dit rijtje. Voor de volledigheid volgen hier echter voor kat en hond twee representatieve curven uit steekproeven van vier.

7.1.5.1. Kat

Alle supramaximale doseringen (fig. 11) vertonen stijgingen van systolische en diastolische bloeddruk, gepaard gaande met frequentie-dalingen. Het ECG blijft daarbij onveranderd. De dosis/ T_{50} -curve is zeer vlak; de RD_{90} ligt tussen 20 en 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. $TL_{90} = 1,25$ min.

7.1.5.2. Hond

Hiervoor geldt precies hetzelfde als voor de kat, met uitzondering van de frequentie. Deze heeft in alle verrichte proeven een stijging te zien gegeven (fig. 12). De RD_{90} ligt gemiddeld bij 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. $TL_{90} = 1,25$ min.

7.1.6.

Voor zover vergelijkbaar blijken bovengenoemde resultaten redelijk overeen te stemmen met gegevens uit de literatuur. Pancuronium echter werkt in onze proefstelling duidelijk korter dan d-tubocurarine, zulks in afwijking van Buckett et al. (1)

(1) Buckett, W.R., Marjoribanks, C.E.B., Marwick, F.A. & Morton, M.B., Brit. J. Pharmacol., 32 (1968), 671.

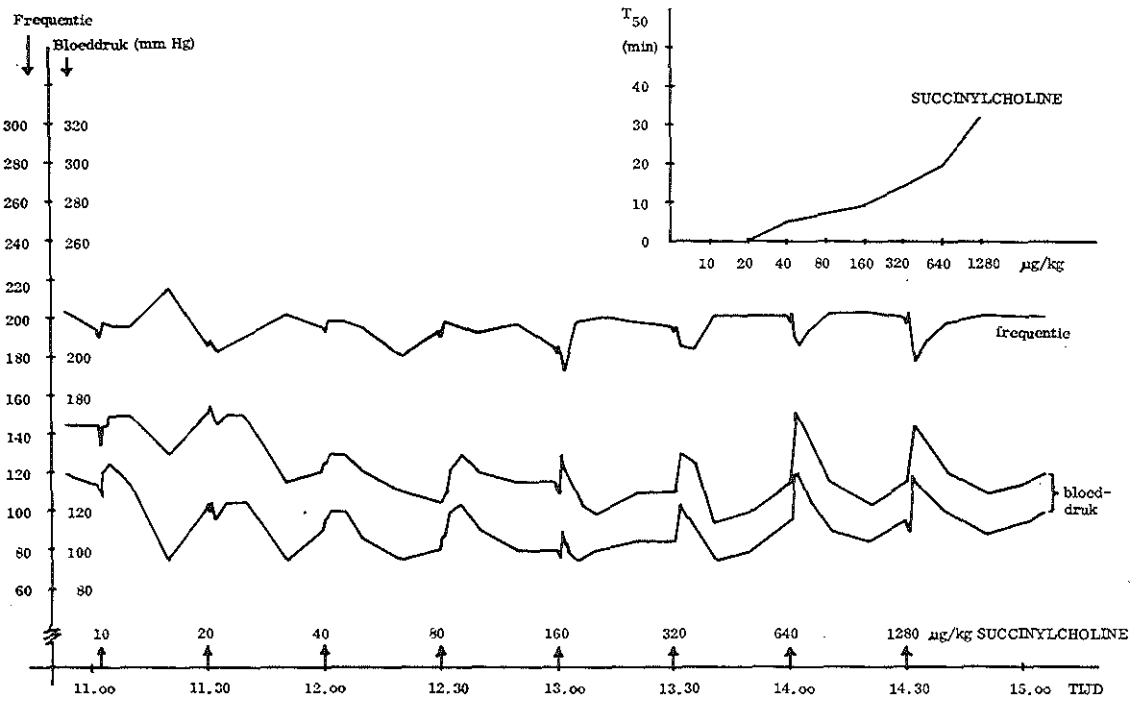


Fig. 11 - Succinylcholine, kat: bloeddruk, frequentie en T₅₀

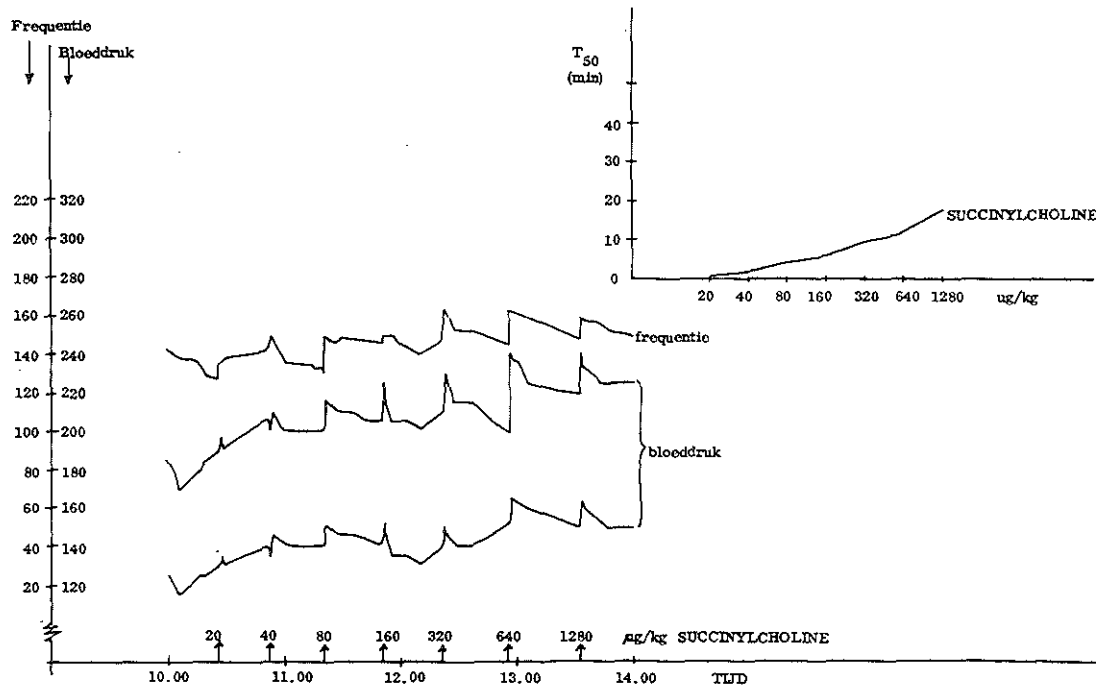


Fig. 12 - Succinylcholine, hond: bloeddruk, frequentie en T₅₀

en Derkx et al. (1), die bij de kat en bij de mens in equieffectieve doseringen een werkingsduur rapporteren gelijk aan die van d-tubocurarine. Crul (persoonlijke mededeling) vindt evenwel dat pancuronium bij de mens korter werkt dan d-tubocurarine: een dosis die juist volledige paralyse geeft is na resp. 33 en 46 minuten uitgewerkt.

Bij deze en alle nog te beschrijven resultaten dient men evenwel te bedenken, dat de inwendige poottemperatuur niet constant gehouden is tijdens en tussen de verschillende proeven, waardoor aanmerkelijke verschillen kunnen ontstaan (2).

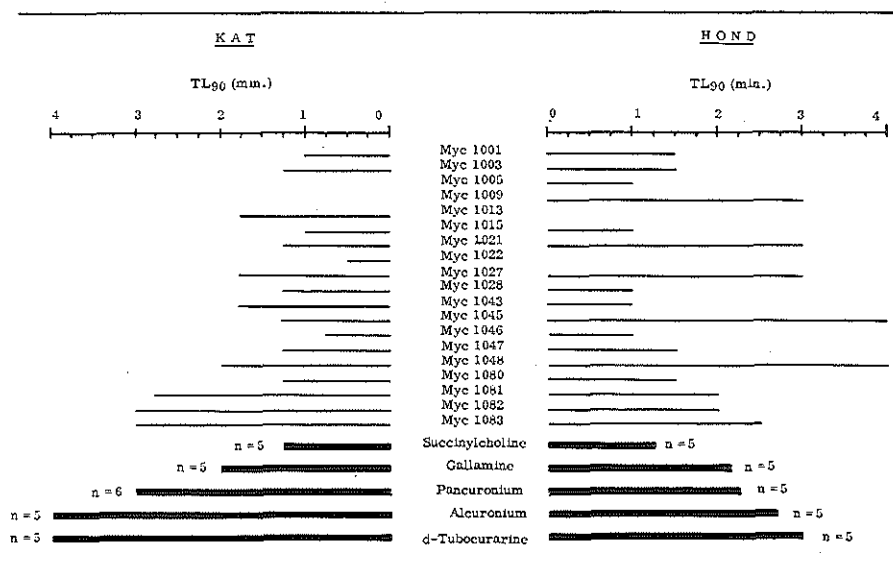
Het is merkwaardig, dat de in de kliniek bekende tachycardie door gallamine bij kat noch hond duidelijk gevonden werd, terwijl de in de kliniek gevreesde bradycardie door succinylcholine bij de hond evenmin werd gezien. Integendeel. Dit betekent dat de voorspelbaarheid van een eventuele invloed van een stof op de hartfrequentie bij de mens uit de gehanteerde dierproeven onzeker is.

7.2. Proeven met gekwaterniseerde conessine-derivaten

7.2.1. Submaximale doseringen bij de kat

7.2.1.1. TL₉₀

Uit tabel 1 (linker helft) blijkt, dat er niet alleen tussen de referentiestoffen grote verschillen bestaan in TL₉₀, maar ook tussen de Myc-stoffen. Er is ruime keus uit verbindingen met een TL₉₀ ≈ de TL₉₀ van succinylcholine (1 min.).



Tabel 1 - Kat en hond; TL₉₀-waarden van de onderzochte Myc-stoffen in vergelijking met referentiestoffen

- (1) Derkx, F.H.M., Bonta, J.L. & Lagendijk, A., Eur. J. Pharmacol., 16 (1971), 105.
 (2) Alderson, A.M. & MacLagan, J., J. Physiol., 173 (1964), 38.

7.2.1.2. RD_{90}

Een overzicht van de RD_{90} -waarden wordt gegeven in tabel 2.

Stof	RD_{90} (mg/kg)	Stof	RD_{90} (mg/kg)
Myc 1001	0,15	Myc 1046	0,40
Myc 1003	0,15	Myc 1047	0,40
Myc 1005	0,25	Myc 1048	0,80
Myc 1007	0,50	Myc 1080	0,50
Myc 1009	0,40	Myc 1081	1,15
Myc 1013	1,50	Myc 1082	1,25
Myc 1015	0,75	Myc 1083	0,35
Myc 1021	0,40	Succinylcholine	0,03
Myc 1022	1,20	Gallamine	0,60
Myc 1027	0,20	Pancuronium	0,04
Myc 1028	0,50	Alcuronium	0,03
Myc 1043	0,80	d-Tubocurarine	0,30
Myc 1045	0,80		

Tabel 2 - RD_{90} -waarden in mg/kg van de serie Myc-stoffen en een aantal referentiestoffen bij katten

7.2.1.3. Dosis-werkingscurven

De $T_{50} = f(R)$ -lijnen voor de verschillende stoffen zijn weergegeven in fig. 13. De gallamine-lijn is een gemiddelde van alle proeven waarbij gallamine als referentiestof is gebruikt. De lijnen van de Myc-stoffen zijn veelal slechts in één proef bepaald.

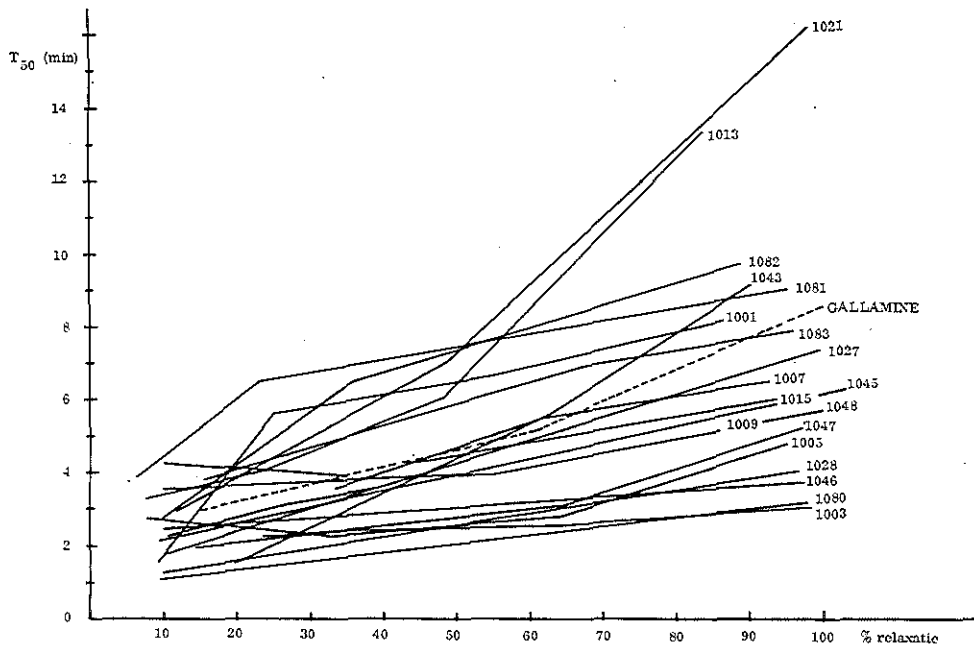


Fig. 13 - Kat, T_{50} als functie van de relaxatie van de onderzochte Myc-stoffen. Referentiestof: gallamine. Lineaire schaal.

7.2.1.4. Relatie TL₉₀-T₅₀ bij RD₉₀

De verdeling van de punten in fig. 14 suggereert dat bij een snel inzettende werking een korte werkingsduur behoort.

Een correlatierekening, toegepast op alle gevonden paren TL₉₀- en T₅₀-waarden, inclusief die van de referentiestoffen, wees op een positief verband ($r = 0,70$; d.f. = 19; $p < 0,001$). Ofschoon dit nog niet betekent, dat voor alle perifere spierrelaxantia geldt, dat bij de RD₉₀ de duur van de TL₉₀ positief gecorreleerd is aan de T₅₀, hebben wij als screeningscriterium wel gesteld, dat de stof een korte TL₉₀ moet paren aan een korte T₅₀.

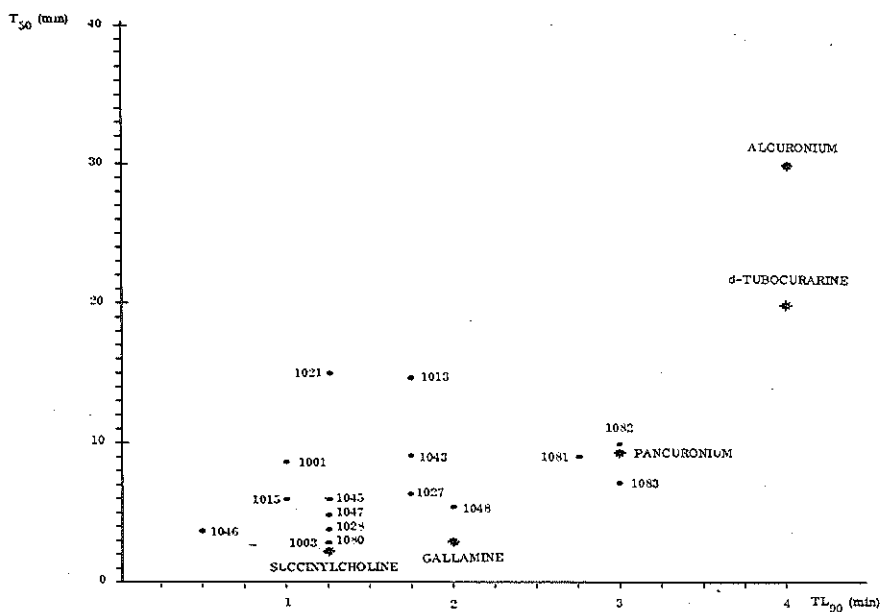


Fig. 14 - Kat. relatie TL₉₀ - T₅₀ bij RD₉₀

7.2.1.5. Hemodynamische parameters

In het onderzochte submaximale gebied werden geen afwijkingen van betekenis gevonden in bloeddruk, hartfrequentie of ECG.

7.2.1.6. Conclusie

Uit de beschreven resultaten blijkt dat er onder de Myc-stoffen een aantal is, dat zich qua TL₉₀ en T₅₀ kan meten met succinylcholine. Omdat de werkingsduur klinisch wel iets langer mag zijn dan die van succinylcholine, komen als belovend in aanmerking Myc 1003, 1015, 1028, 1045, 1046, 1047 en 1080.

Hemodynamische afwijkingen werden niet gezien.

Op grond van deze bevindingen werd besloten alle verbindingen in supramaximale doseringen bij de hond te onderzoeken.

7.2.2. Supramaximale doseringen bij honden

7.2.2.1. TL₉₀

Ook bij honden blijken er verschillen in snelheid van inzetten van de werking te bestaan (tabel 1, rechter helft).

Afgezien van enkele uitschieters komen de waarden redelijk goed overeen met die bij de kat.

7.2.2.2. RD₉₀

In tabel 3 staan de RD₉₀-waarden vermeld in mg/kg.

Stof	RD ₉₀ (mg/kg)	Stof	RD ₉₀ (mg/kg)
Myc 1001	0,4	Myc 1046	0,8
Myc 1003	0,25	Myc 1047	1,5
Myc 1005	0,25	Myc 1048	0,8
Myc 1007	- *)	Myc 1080	0,5
Myc 1009	1,5	Myc 1081	0,8
Myc 1013	- *)	Myc 1082	1,2
Myc 1015	2,5	Myc 1083	0,3
Myc 1021	1,5		
Myc 1022	- *)	Succinylcholine	0,04
Myc 1027	0,4	Gallamine	0,6
Myc 1028	0,8	Alcuronium	0,015
Myc 1043	0,8	Pancuronium	0,02
Myc 1045	2,5	d-Tubocurarine	0,5

*) niet meer voldoende stof aanwezig.

Tabel 3 - RD₉₀-waarden in mg/kg van de serie Myc-stoffen en een aantal referentiestoffen bij honden

7.2.2.3. Dosis-werkingscurve

In het supramaximale dosisgebied geldt de betrekking $T_{50} = f(R)$ niet meer, omdat R steeds 100% is.

Daarom is in fig. 15 $T_{50} = g(D)$ weergegeven; in fig. 16 zijn deze lijnen nogmaals getekend, maar nu is de dosis uitgedrukt in RD₉₀-eenheden. Het is interessant te zien, hoe groot de invloed van het logaritmeren van de abscis is: de dosisschaal is in fig. 15 logaritmisch, in fig. 16 lineair weergegeven. Het duidelijkst komt het beeld naar voren als de resultaten op lineaire schaal worden uitgezet.

Myc 1003, 1028, 1046 en 1080 zijn verbindingen, waarvan de T₅₀ ook bij supramaximale doseringen slechts langzaam toeneemt, m.a.w. zij blijven over een zeer groot dosisgebied kortwerkend.

7.2.2.4. Relatie TL₉₀-T₅₀ bij RD₉₀

Ook bij honden suggereert de verdeling van de punten in fig. 17, dat een snel inzettende werking correspondeert met een korte werkingsduur.

Een correlatierekening, toegepast op alle gevonden paren TL₉₀- en T₅₀-waarden, inclusief die van de referentiestoffen, wees op een positief verband ($r = 0,56$; d.f. = 20; $p < 0,01$).

De Myc-stoffen 1003, 1015, 1028, 1046, 1047 en 1080 vormen evenals bij de kat een groep van stoffen, die voor selectie in aanmerking komen.

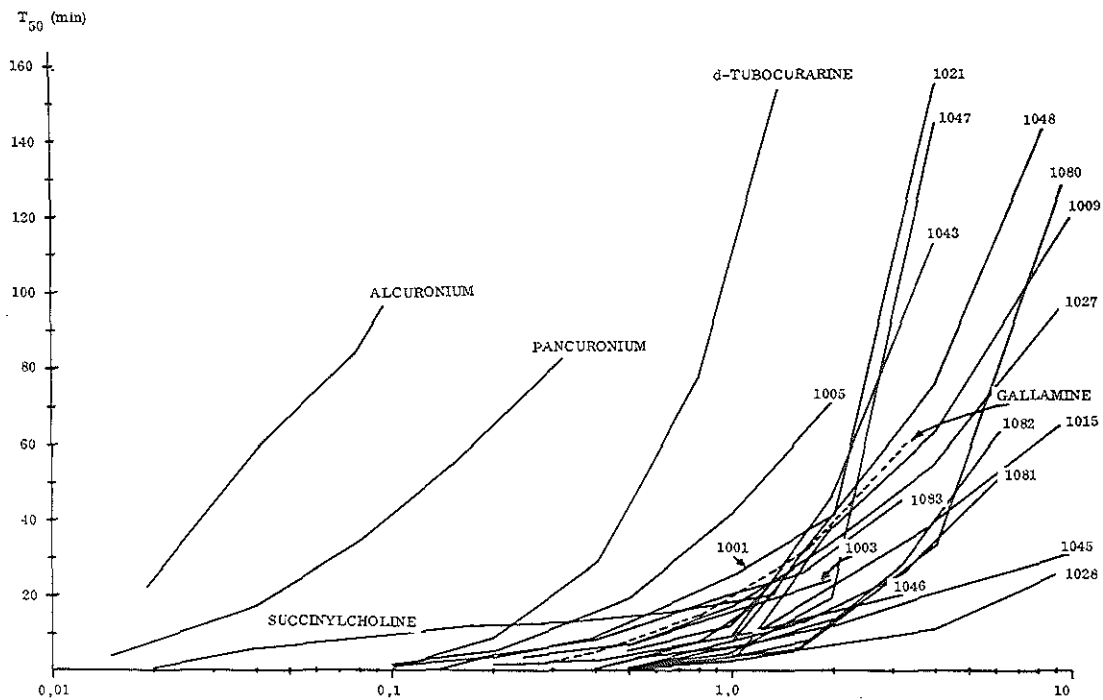


Fig. 15 - Hond, T_{50} als functie van de dosis van de onderzochte Myc-stoffen. Vergelijking met referentiestoffen. Semilogaritmische schaal

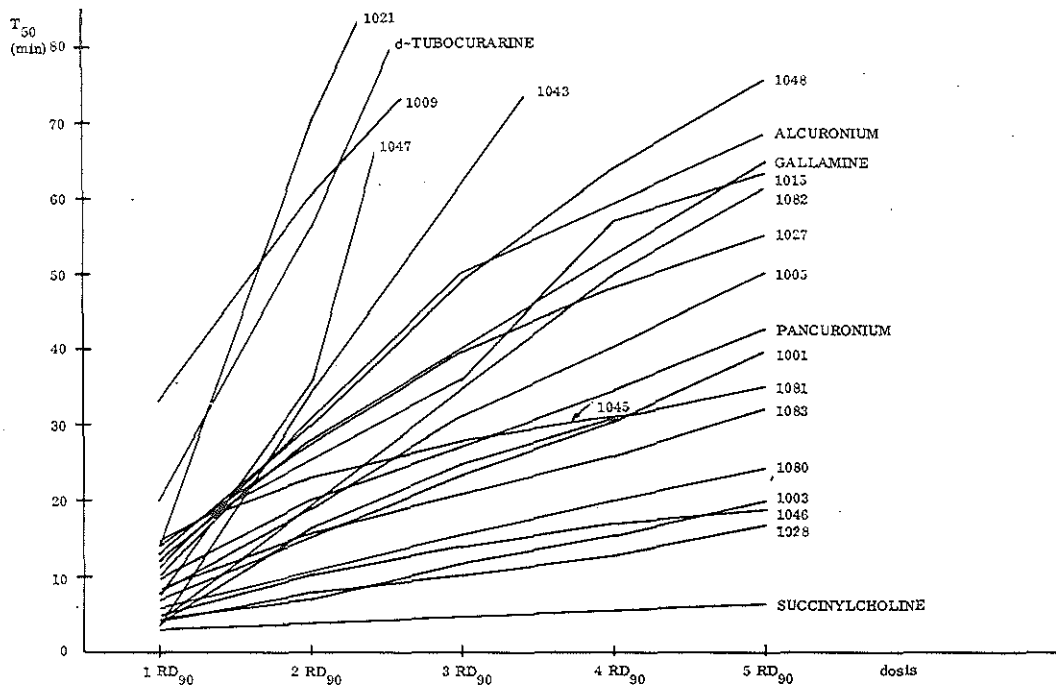


Fig. 16 - Hond, T_{50} als functie van de dosis, uitgedrukt in RD_{90} -eenheden. Vergelijking van de onderzochte Myc-stoffen met referentiestoffen. Lineaire schaal

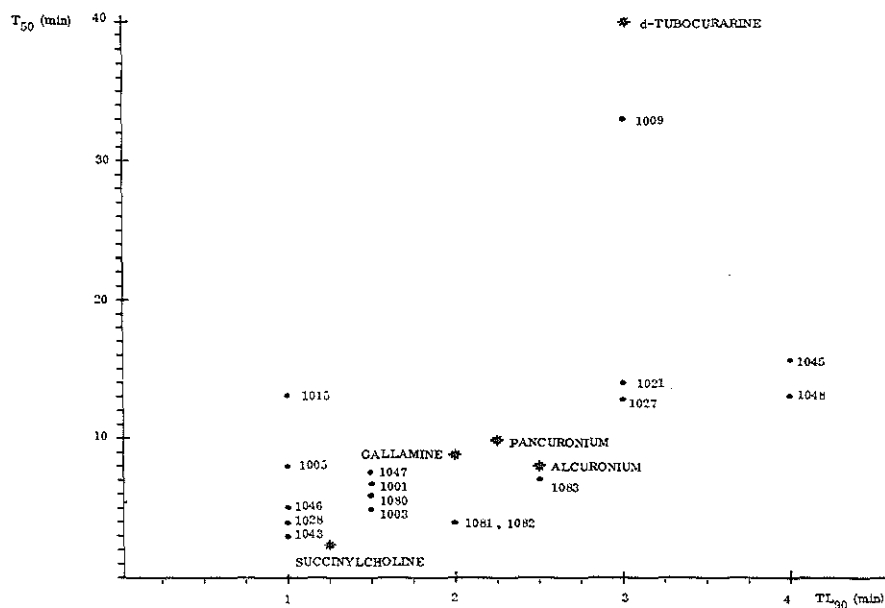


Fig. 17 - Hond. relatie TL₉₀ - T₅₀ bij RD₉₀

7.2.2.5. Invloed op bloeddruk, hartfrequentie en ECG

Tabel 4 geeft een overzicht van de verhouding tussen de dosis waarboven afwijkingen beginnen op te treden in bloeddruk, hartfrequentie of ECG en de RD₉₀.

Myc nr.	Bloeddruk	Frequentie	ECG
1001	1	1	2
1003	5-10	10-20	5
1005	> 4	> 4	> 4
1009	1-2	2-4	2
1015	2-4	< 1	< 1
1021	3-6	3-6	6
1027	10-20	10-20	10-20
1028	4-6	2-4	1-2
1043	2-4	2-4	10
1045	1	< 1	< 1
1046	< 1	< 1	< 1
1047	< 1	< 1	< 1
1048	< 1	< 1	2-4
1080	5-10	5-10	5
1081	2	2	> 10
1082	1	1	< 1
1083	4	< 1	> 4

Tabel 4 - Hond. Verhouding tussen de dosis, waarbij hemodynamische en ECG-veranderingen beginnen op te treden en de RD₉₀

N.B. Van Myc 1007 en Myc 1013 was voor deze proeven niet voldoende stof aanwezig.

Als stoffen met weinig cardiovasculaire werkingen komen hieruit naar voren: Myc 1003, 1005, 1021, 1027 en 1080.

7.2.2.6. Antagoneerbaarheid

Aan het eind van een aantal proeven is nagegaan of de paralyse kon worden geantagoneerd met geschikte doses neostigmine en edrophoniumchloride. Dit bleek steeds het geval. De stoffen zijn dus vrij zeker van het niet-depolariserende type.

7.2.3. Selectie

Op grond van de TL_{90} en T_{50} van de RD_{90} bij kat en hond kwamen voor verder onderzoek in aanmerking Myc 1003, 1015, 1028, 1046, 1047 en 1080. Hiervan blijven Myc 1003, 1028, 1046 en 1080 ook bij supramaximale doseringen kortwerkend.

Gelet op de hemodynamische bijwerkingen is Myc 1028 minder gunstig, althans bij de hond. Dit geldt in sterkere mate ook voor Myc 1046.

Myc 1005 is, hoewel hemodynamisch gunstig, te lang werkend voor verder onderzoek.

Daarom werd besloten bij de kat, eveneens oriënterend, Myc 1003, 1028 en Myc 1080 te onderzoeken.

7.2.4. Nader onderzoek bij katten

Onderzocht werden de onder 7.2.3. geselecteerde stoffen Myc 1003, 1028 en Myc 1080.

7.2.4.1. Resultaten

Fig. 18 geeft een overzicht van de T_{50} als functie van supramaximale doseringen, uitgedrukt in RD_{90} -eenheden.

Tabel 5 geeft een overzicht van de invloed van deze stoffen op bloeddruk, hartfrequentie en ECG, uitgedrukt in aantal malen RD_{90} waarboven hemodynamische afwijkingen beginnen op te treden.

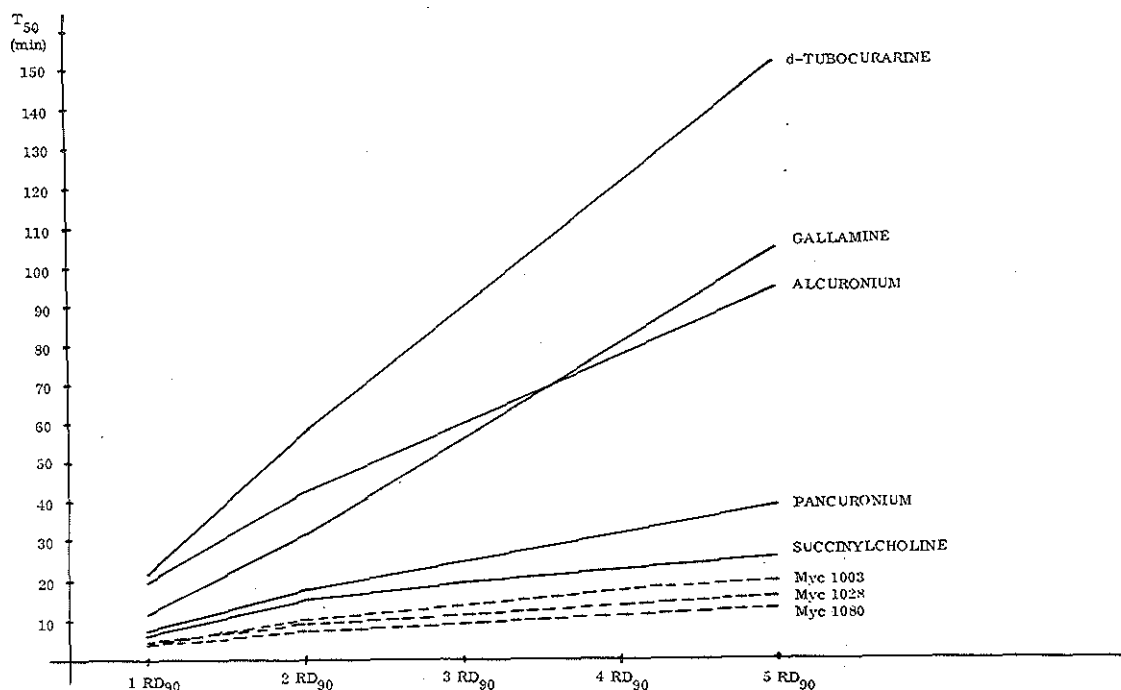


Fig. 18 - T_{50} als functie van de dosis, uitgedrukt in RD_{90} -eenheden. Vergelijking van 3 voorlopig geselecteerde stoffen met referentiestoffen. Lineaire schaal.

Myc nr.	RD ₉₀ (mg/kg)	BLOEDDRUK	FREQUENTIE	ECG
1003	0,5	2	>5	>5
1028	0,5	<1	1	2
1080	0,6	6	4	8

Tabel 5 - Kat. Verhouding tussen de dosis, waarbij hemodynamische en ECG-veranderingen beginnen op te treden en de RD₉₀.

7.2.4.2. Nadere selectie

Op grond van deze gegevens werd Myc 1080 uitgekozen voor verdere evaluatie. De werking zet zowel bij de hond als bij de kat snel in en is kort van duur, ook in het supramaximale dosisgebied. In deze opzichten kan de stof zich meten met succinylcholine. Hemodynamische bijwerkingen beginnen op te treden bij doseringen redelijk ver gelegen boven de RD₉₀.

Onderzocht zullen worden: - eventuele histamine-vrijmaking
- marge tussen eindplaatremmende en ganglionblokkerende dosis.

Mocht de stof onvermoed toch depolariserende (bij)werkingen hebben, dan dient de invloed op speeksel- en bronchiaalsecretie te worden onderzocht.

- 2.2. Bepaling van de snelheid van eliminatie, m.a.w. de kans op ontoelaatbare cumulatatie.
- 2.3. Het is denkbaar, dat de stof als kwaternaire ammoniumbase met een grote lipofiele groep een oppervlaktetenspanningsverlagende werking heeft, met als mogelijk gevolg een verlaagde osmotische weerstand van de erythrocyten.
- 2.4. Het is waarschijnlijk ver gezocht, maar doordat de stof een steroid is, zouden er nog residuen van hormonoïde werkingen aanwezig kunnen zijn.
- 2.5. Omdat de stof ook bij sectio caesarea bruikbaar moet zijn, dient de placenta-passage te worden nagegaan.

3. Toxiciteit

Door het karakter van de hoofdwerking zal het onderzoek naar de acute toxiciteit, i.c. de LD₅₀-waarden, neerkomen op het bepalen van een dosis-werkingscurve, waaruit zijn af te leiden ED₁₀ (=LD₁₀), ED₅₀ (=LD₅₀) en ED₉₀ (=LD₉₀). Van meer waarde voor echte toxicologische bijwerkingen is een onderzoek waarbij de stof dagelijks wordt gegeven - onder kunstmatige beademing en een lichte anesthesie - gedurende een aantal weken in enkele doseringen, waarbij en waarna wordt nagegaan of en zo ja welke veranderingen er in het dier hebben plaatsgegrepen.

4. Lot in het organisme

Hierbij is een aantal facetten te onderscheiden:

- 4.1. de relatie tussen bloedspiegel en eindplaatremmende werking
- 4.2. verdeling in het organisme, ook bij zwangere dieren
- 4.3. eliminatie.

Voor deze proeven is radioactief gemerkte stof gebruikt.

5. Interacties met andere stoffen

Het is wenselijk iets te weten te komen over eventuele interacties met stoffen die veelvuldig bij de anesthesie worden toegepast.

6. Houdbaarheid en toxiciteit van ontledingsprodukten

De houdbaarheid van een gereede oplossing is een farmaceutisch-chemisch probleem. De bij eventuele ontleding vrijkomende afbraakprodukten moeten op toxicologische aspecten worden onderzocht.

In de volgende hoofdstukken zullen alle genoemde punten aan de orde komen.

HOOFDSTUK VII

BEVESTIGING EN TYPERING VAN DE HOOFDWERKING

1. Bevestiging van de hoofdwering

In een serie proeven met 7 katten, 21 honden en 12 apen werd de dosis/ T_{50} -curve nauwkeurig bepaald.

De berekende best-passende lijnen zijn weergegeven in fig. 19.

De uit deze proeven resulterende, nauwkeuriger geschatte RD_{90} -waarden bedroegen voor

	RD_{90}	SE_{mean}	n
AAP	0,28	0,03	12
HOND	0,42	0,03	21
KAT	0,46	0,05	7

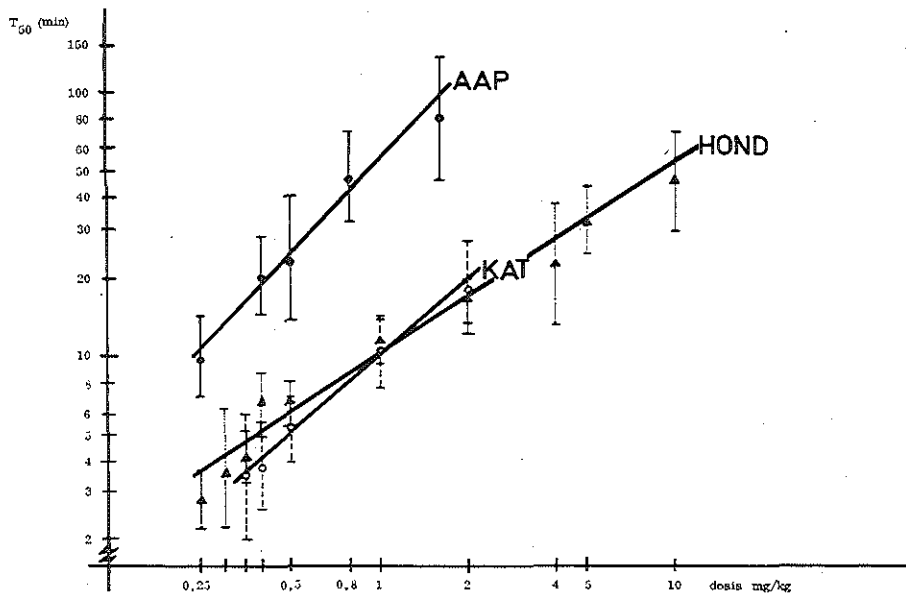


Fig. 19. - Dosis - T_{50} -lijnen van Myc 1080 bij aap, kat en hond.
Logaritmische schaal

De aap is blijkbaar iets gevoeliger voor Myc 1080.

De werking zet zeer snel in: met supramaximale doseringen binnen 30 seconden. Of dit voldoende snel is en voor de pharynx- en larynxspieren diep genoeg om bij de mens voor intubatie bruikbaar te zijn, is hieruit niet te zeggen.

De intubatie bij de proefdieren gaat veel soepeler dan bij de mens.

De werkingsduur is kort en verschilt weinig bij de kat en de hond, maar is aanzienlijk langer bij de aap.

De figuren 20, 21 en 22 geven voorbeelden van het hemodynamische gedrag van hond, kat en aap na toediening van stijgende doseringen Myc 1080.

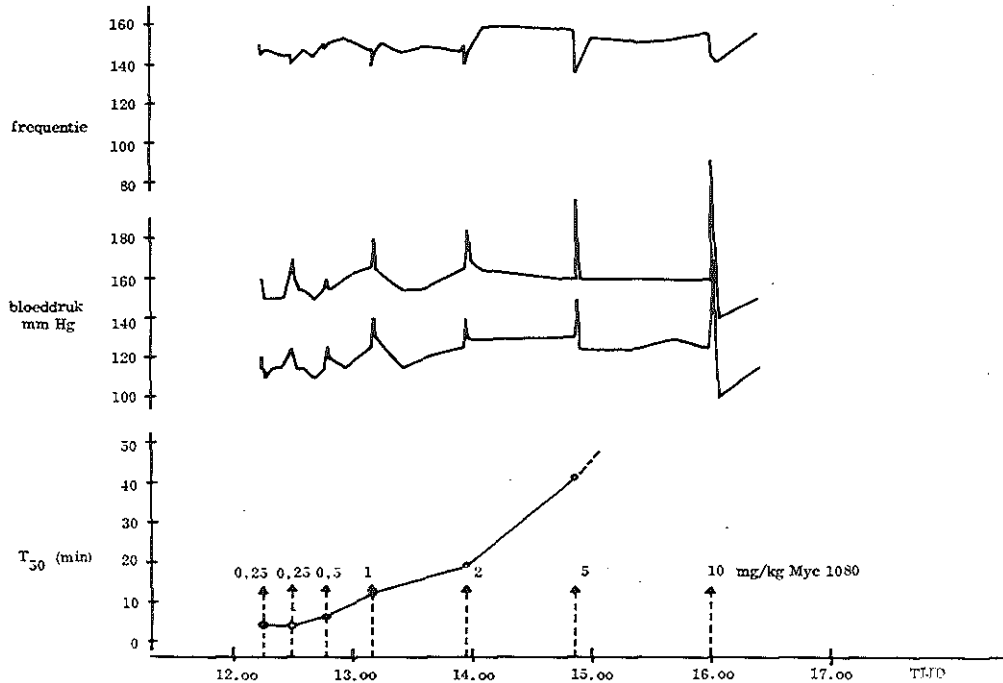


Fig. 20 - Myc 1080, hond φ , 9,1 kg; bloeddruk, frequentie en T_{50}

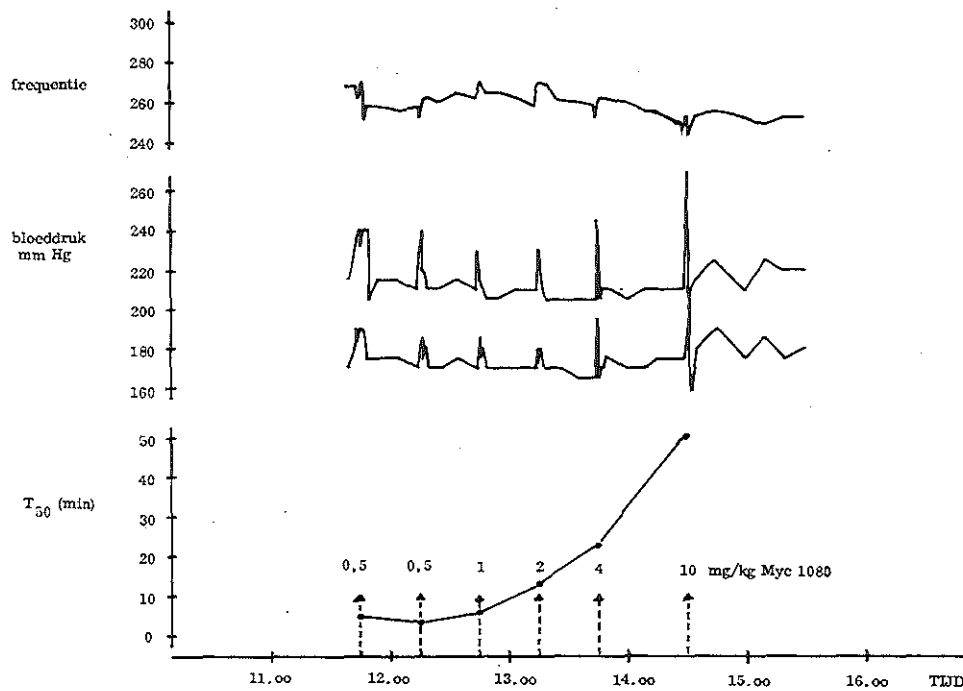


Fig. 21 - Myc 1080, kat φ , 2,3 kg; bloeddruk, frequentie en T_{50}

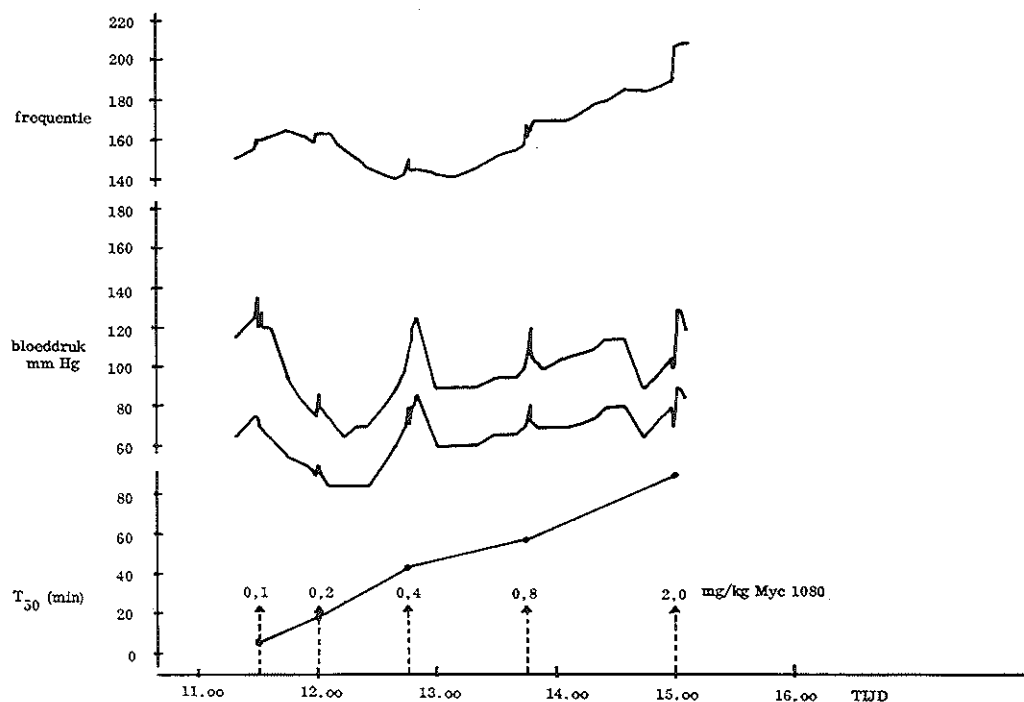


Fig. 22 - Myc 1080, aap φ 6.0 kg; bloeddruk, frequentie en T_{50}

2. Typering van de hoofdwerking

Uit de primaire screening was reeds het vermoeden gerezen, dat de gekwaterniseerde conessine-derivaten met eindplaatremmende werking behoren tot de groep van de competitief werkende niet-depolariserende verbindingen, omdat de werking antagonistisch bleek met neostigmine en edrophonium.

Dit type eindplaatremmers onderscheidt zich van andere perifeer werkende spierrelaxantia door de volgende kenmerken (1):

2.1. Bij zoogdierspieren

Slappe verlamming zonder fasciculaties na een - in vergelijking met stoffen van het hemicholinetype - korte latente tijd en antagonistisch ervan door acetylcholinesteraseremmers en depolariserende eindplaatremmers.

2.2. Bij kikker- en vogelspieren

Slappe verlamming zonder fasciculaties en antagonisme met acetylcholinesteraseremmers en depolariserende eindplaatremmers.

2.3. Een redelijk grote marge tussen de RD_{90} en de dosis die een 50% remming van acetylcholinesterase teweegbrengt.

(1) Linssen, G.H., Academisch Proefschrift (1961), Nijmegen.

Gaan we thans na of de stof beantwoordt aan deze criteria:

Ad 2.1. Zoogdierspieren

Slappe verlamming zonder fasciculaties na een korte latente tijd en antagonistische-
heid ervan door cholinesteraseremmers en depolariserende eindplaatremmers

De slappe verlamming is reeds uit voorgaande proeven gebleken en wordt bevestigd in nog te beschrijven proeven.

Nimmer zijn fasciculaties gezien, terwijl de verlamming compleet is binnen twee circulatietijden (binnen 30 seconden).

Antagonisme met cholinesteraseremmers i. c. neostigmine was reeds gevonden in de primaire screening bij de geanestheerde hond, terwijl eveneens een antagonistische bleek met succinylcholine bij de kat (Hoofdstuk XI).

Ad 2.2. Kikker- en vogelspieren

Slappe verlamming zonder fasciculaties en antagonisme met cholinesteraseremmers en depolariserende eindplaatremmers

De volgende proeven zijn gebaseerd op de overweging, dat depolariserende stoffen zoals decamethonium en succinylcholine, bij kip- en kikkerspieren een contractuur teweegbrengen, die door niet-depolariserende stoffen geantagoneerd kan worden, terwijl niet-depolariserende stoffen zoals d-tubocurarine een slappe verlamming geven, die antagonistisch is met cholinesteraseremmers, zoals neostigmine of edrophonium.

2.2.1. Proeven in vitro

2.2.1.1. Geïsoleerd M. -semispinalis-preparaat van het kuiken volgens Child en Zaimis (1).

Myc 1080 7×10^{-5} M geeft geen contractuur.

Decamethonium $2,5 \times 10^{-7}$ M geeft wel een contractuur, die voor 50% te antagoneeren is met een even grote dosis Myc 1080.

2.2.1.2. Geïsoleerde M. rectus abdominis van de kikker. *)

Fig. 23 toont een competitief antagonisme tussen succinylcholine en resp. Myc 1080, d-tubocurarine en gallamine.

Hieruit worden berekend voor:

MYC 1080	$pA_2 = 6,10$ $s = 0,274, n = 36$	$pD'_2 = 4,52$ $s = 0,280, n = 17$
d-tubocurarine	$pA_2 = 6,51$ $s = 0,176, n = 23$	$pD'_2 = 4,49$ $s = 0,176, n = 4$
gallamine	$pA_2 = 5,34$ $s = 0,221, n = 27$	$pD'_2 = 4,21$ $s = 0,325, n = 7$

*) Proefresultaten bereidwillig afgestaan door Prof. Dr. E. J. Ariëns.

(1) Child, K. J. & Zaimis, E. J., Brit. J. Pharmacol., 15 (1960), 412.

Door toetsing vindt men:

pA_2 : Myc 1080/d-tubocurarine	$t = 6,54$; d.f. = 57 ; $p < 0,001$
Myc 1080/gallamine	$t = 12,70$; d.f. = 61 ; $p < 0,001$
pD'_2 : Myc 1080/d-tubocurarine	$t = 0,20$; d.f. = 20 ; $p > 0,80$
Myc 1080/gallamine	$t = 2,46$; d.f. = 22 ; $p < 0,05$

Uit de pA_2 -waarden voor deze drie stoffen kan men berekenen, dat de affiniteit van d-tubocurarine voor de acetylcholinereceptor in de motorische eindplaat 2,6 x zo groot is als van Myc 1080 en 15 x zo groot als van gallamine.

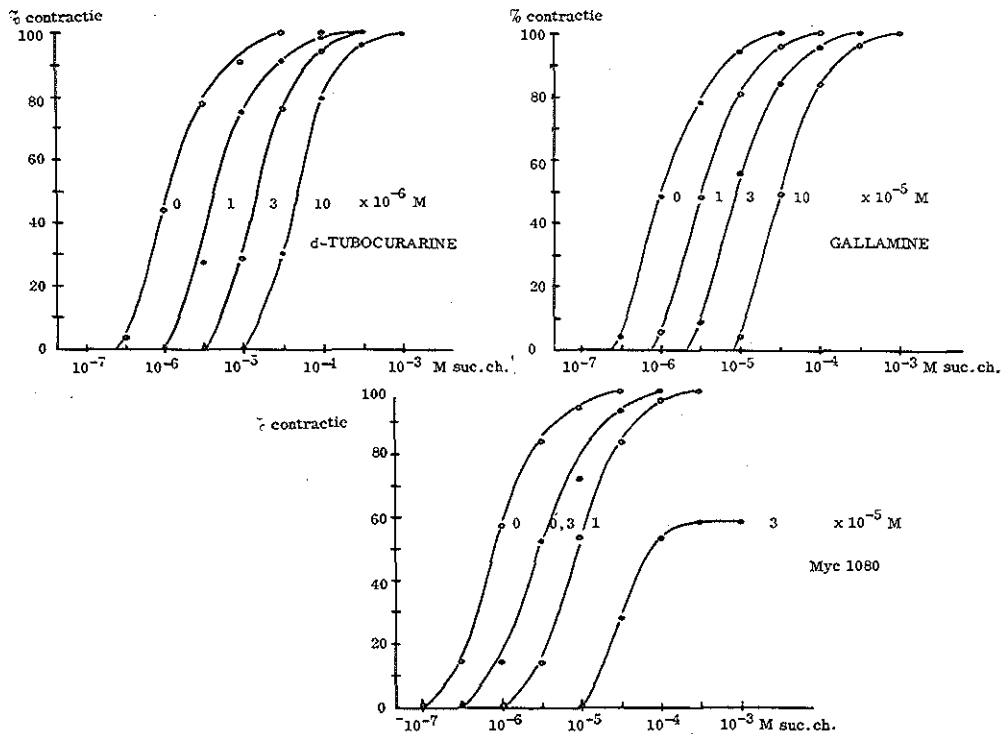


Fig. 23 - *M. rectus abdominis* kikker. Cumulatieve dosis-werkingscurven met succinylcholine zonder en met verschillende concentraties Myc 1080, d-tubocurarine of gallamine in het orgaanbad.

2.2.2. Proeven in vivo

Kuikens van 42-45 gram kregen intraveneus d-tubocurarine, Myc 1080 of succinylcholine in doseringen van 5 mg/kg. Bij het optreden van een slappe verlamming werd 0,05 mg neostigmine gespoten in het sternum van het proefdier om te zien of de verlamming kon worden geantagoneerd.

Resultaten:

d-Tubocurarine veroorzaakt een slappe verlamming, die na 5 minuten maximaal is geworden zonder fasciculaties. Neostigmine-injectie leidt tot een tijdelijk partiël herstel.

Myc 1080 veroorzaakt eveneens een slappe verlamming zonder fasciculaties, die na 3 minuten maximaal is en - gelet op lichaamshouding en gedrag - met neostigmine meer compleet geantagoneerd wordt dan de d-tubocurarine-verlamming.

Succinylcholine veroorzaakt binnen 1 minuut een contractuur van alle dwarsgestreepte spieren, waardoor het diertje in een typische houding sterft 4 minuten na de injectie.

De foto's (fig. 24) illustreren de verschillen.

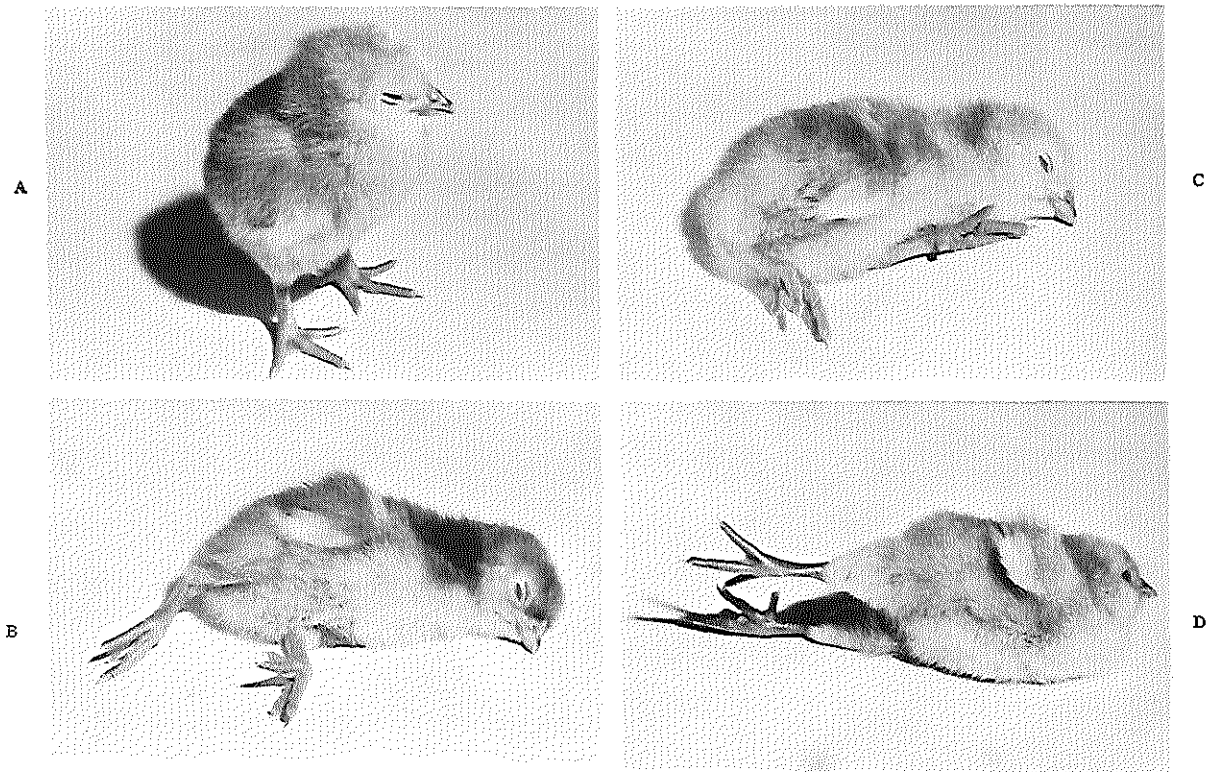


Fig. 24 - Effect van enkele eindplaatremmers op de lichaamshouding van het kuiken

A = normaal kuiken

C = d-tubocurarine 5 mg/kg i.p.

B = Myc 1080 - 5 mg/kg i.p.

D = succinylcholine 5 mg/kg i.p.

Ad 2.3. Geen of zwakke acetylcholinesteraseremming

De acetylcholinesteraseremmende werking van Myc 1080 werd vergeleken met een specifieke acetylcholinesteraseremmer, het neostigmine, volgens de methode van Jensen-Holm (1). Op enkele punten wijkt de door ons gebruikte procedure enigszins af van die van Jensen-Holm.

(1) Jensen-Holm, J., Acta Pharmacol. Toxicol., 18 (1961), 379.

2.3.1. Proefopstelling

2.3.1.1. Principe

Acetylcholinesterase van humane erythrocyten komt sterk overeen met dat van de motorische eindplaten. Door erythrocyten zo goed mogelijk te scheiden van pseudocholinesterase-bevattend plasma en te hydrolyseren verkrijgt men een enzymoplossing, die, tezamen gebracht met acetylcholine, het specifieke substraat, hieruit choline en azijnzuur vrijmaakt. Door het vrijgekomen azijnzuur daalt de pH van de oplossing.

Met behulp van een automatische titrator wordt gedurende het verloop van de reactie steeds voldoende loog toegevoegd om de pH constant te houden. De hoeveelheid per minuut toegevoegd loog is een maat voor de enzymactiviteit.

Voegt men tevoren een acetylcholinesteraseremmer toe, dan is de snelheid waarmee azijnzuur vrijkomt geringer, hetgeen blijkt uit de geringere snelheid waarmee loog moet worden toegevoegd.

Voor goede vergelijking zijn rechte titratiecurven gewenst, dus reacties van de 0-de orde. Daarvoor is nodig een constante substraatconcentratie. Deze kan men bereiken door met dezelfde automatische titrator tegelijk met de loog evenveel acetylcholine toe te voegen als er ontleedt, of een voldoende grote overmaat toe te voegen, zodat althans gedurende geruime tijd de reactie van de 0-de orde blijft.

Jensen-Holm gebruikt de eerste, wij gebruikten de tweede methode.

2.3.1.2. Details van de proefopstelling

De opstelling is schematisch weergegeven in fig. 25.

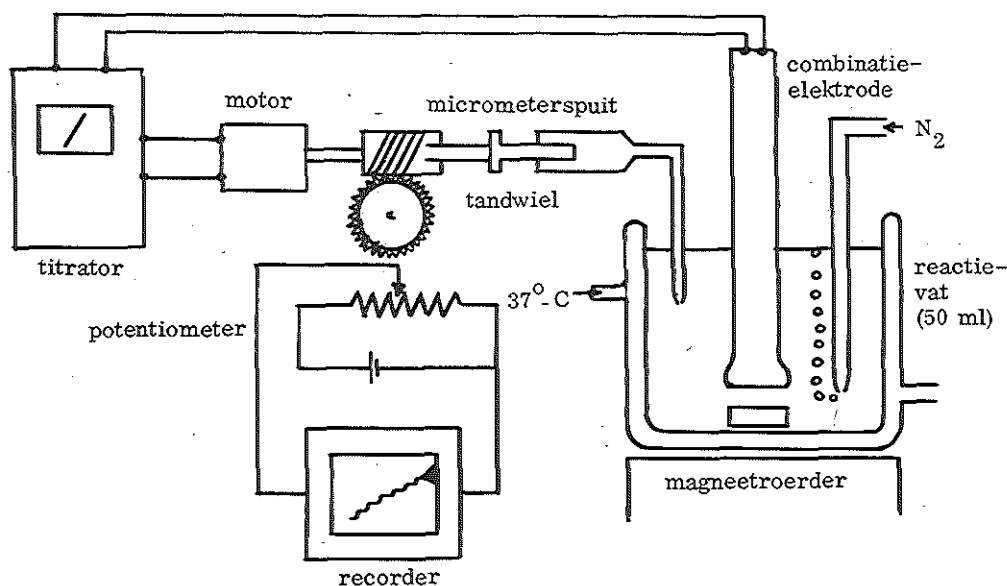


Fig. 25 - Schema van de proefopstelling ter meting van de activiteit van acetylcholinesterase als functie van de concentratie remstof in het reactiemengsel.

De automatische titrator van Radiometer, model TTT 1d, drijft de motor van Indola aan (12 omwentelingen per minuut), wanneer de pH van de reactievloeistof (37° en $\text{pH} = 7,40$), geregistreerd via een combinatie-elektrode (glas/calomel), begint te dalen. De rotaties

van de motor worden overgebracht op de micrometer van een Agla-microinjectiespuit gevuld met 0,01 N NaOH. De omwentelingen van de Agla-micrometer worden via een wormwiel overgebracht op een tandwiel, dat een potentiometer bedient. De spanningsverandering op de potentiometer wordt geregistreerd op een Texas Instrument recorder, model Recti Riter P.P.R., waarvan het papier met een constante snelheid van 1 inch per minuut loopt. Omdat injectiespuit en potentiometer simultaan worden aangedreven, registreert de recorder in feite het NaOH-verbruik als functie van de tijd. De N₂-doorborreling dient om CO₂ te verwijderen. Met behulp van een magneetroerder wordt een snelle intensieve menging van de reactiecomponenten verkregen.

2.3.1.3. Reagentia

NaOH-oplossing 0,01 N (carbonaatvrij).

Fysiologische zoutoplossing.

Substraat: acetylcholinechloride opgelost in gedestilleerd en gedeïoniseerd water. Na toevoegen aan het reactievat bedraagt de concentratie 10^{-4} M.

Enzymoplossing: deze wordt bereid door 10 ml gehepariniseerd humaan bloed te centrifugeren gedurende 10 minuten bij 3000 omwentelingen per minuut, het plasma te vervangen door eenzelfde hoeveelheid fysiologisch zout en voorzichtig te mengen. Dit wassen met fysiologisch zout wordt twee maal herhaald, waarna het fysiologisch zout wordt vervangen door gedeïoniseerd water tot een volumen gelijk aan drie maal het totale volumen der erythrocyten.

2.3.1.4. Procedure

Aan de 50 ml fysiologisch zout in het reactievat wordt toegevoegd 0,4 ml van de enzymoplossing, waarna de pH wordt gebracht op de - op de titrator ingestelde - waarde van 7,40. Door de oplossing laat men gedurende 10 minuten stikstofgas borrelen om CO₂ te elimineren. In het algemeen ziet men, dat de titrator in die tijd wat NaOH toevoegt aan de vloeistof. Dit is verklaarbaar uit het vrijkomen van niet-specifieke zuren. Pas wanneer alle niet-specifieke zuur is weggetitreerd, wordt substraat toegevoegd tot een concentratie van 10^{-4} M. De ontstane titratiecurve is een rechte lijn.

Om remming van het acetylcholinesterase te meten voegt men de remstof toe 3 minuten vòòr de toevoeging van het substraat.

2.3.1.5. Interpretatie

Enzymremming gaat gepaard met een vlakkere titratiecurve.

Fig. 26 geeft een voorbeeld van toenemende enzymremming bij toenemende neostigmineconcentratie.

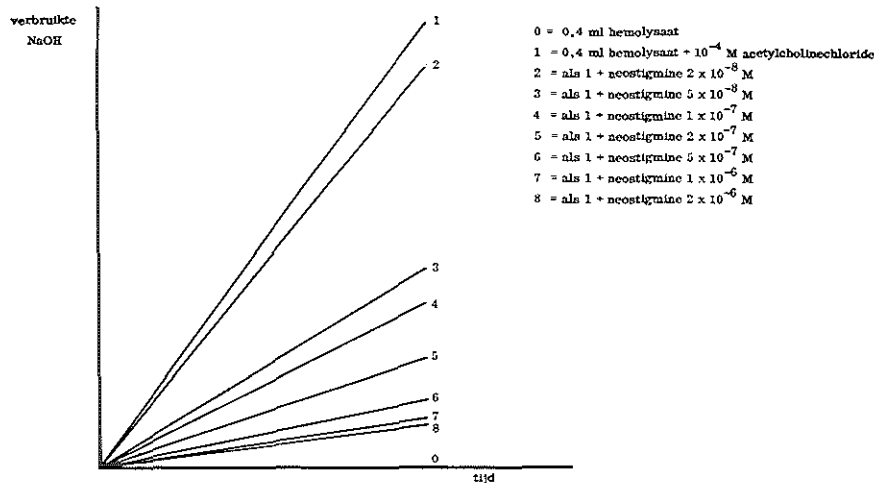


Fig. 26 - Titratiecurves van de activiteit van humane erythrocytencholinesterase bij aanwezigheid van verschillende concentraties neostigmine in het reactiemengsel.

De tangenten van de hellingshoeken $\alpha = \frac{\Delta \text{NaOH}}{\Delta t}$ correleren met de reactiesnelheden. Deze nemen blijkens fig. 26 af met toenemende concentratie inhibitor.

Voor competitieve enzymremming kan men de volgende betrekking berekenen:

$$\frac{v_{\max}}{v} = \frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{K_m}{K_I} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot [I]$$

waarin K_m = Michaelis-constante = de evenwichtsconstante van $E + S \rightleftharpoons ES$
 $[S]$ = substraatconcentratie
 K_I = evenwichtsconstante van de reactie $E + I \rightleftharpoons EI$
 $[I]$ = concentratie van de remstof
 v_{\max} = de reactiesnelheid bij $[I] = 0$, dus de reactiesnelheid bij afwezigheid van remstof
 v = de reactiesnelheid bij een bepaalde concentratie remstof.

Als, door $[S]$ in grote overmaat te kiezen deze praktisch constant is, zijn $\frac{K_m}{[S]} + 1$ en $\frac{K_m}{K_I} \cdot \frac{1}{[S]}$ constant. De formule kan dan worden weergegeven door een rechte lijn.

Toegepast op de tangenten van de hellingshoeken α als functie van $[I]$, is $\frac{v_{\max}}{v} = \frac{\text{tg } \alpha_0}{\text{tg } \alpha_1}$, waarin α_0 = de hoek, die lijn 1

(fig. 26) maakt met de tijd-as ($[I] = 0$) en α_1 de hoek behorend bij $[I]$ (de hellingshoek van de lijnen 2, 3, 4, etc.).

Onder I_{50} wordt verstaan de inhibitorconcentratie, die de reactiesnelheid (=de enzymactiviteit) met 50% reduceert.

Dus $v = \frac{1}{2} v_{\max}$, waaruit volgt $\frac{v_{\max}}{v} = 2$ (fig. 27). Men gebruikt ook wel het symbool $pI_{50} = -\log [I]_{50}$.

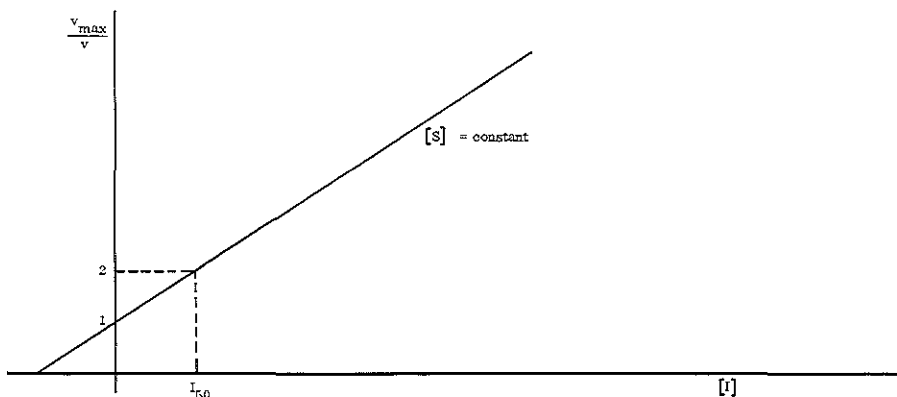


Fig. 27 - $\frac{v_{\max}}{v}$ als functie van de concentratie remstof I in het reactiemengsel.

Bij vergelijking van de activiteit van zuiver competitieve antagonisten in hetzelfde experimentele systeem ontstaan v_{\max}/v -curven met verschillende hellingshoek, alle gaande door hetzelfde snijpunt van de ordinat.

Hoe steiler de lijn, des te actiever de enzymremmer.

2.3.2. Resultaten

In fig. 28 zijn de lijnen weergegeven zoals die bepaald zijn voor Myc 1080 en enkele referen-tiestoffen. De hieruit opgemeten I_{50} -waarden bedragen:

	I_{50}
Myc 1080	$3 \cdot 10^{-5}$
d-tubocurarine	$2,3 \cdot 10^{-4}$
alcuronium	$1 \cdot 10^{-4}$
edrophonium	$1 \cdot 10^{-5}$
neostigmine	$5,4 \cdot 10^{-5}$

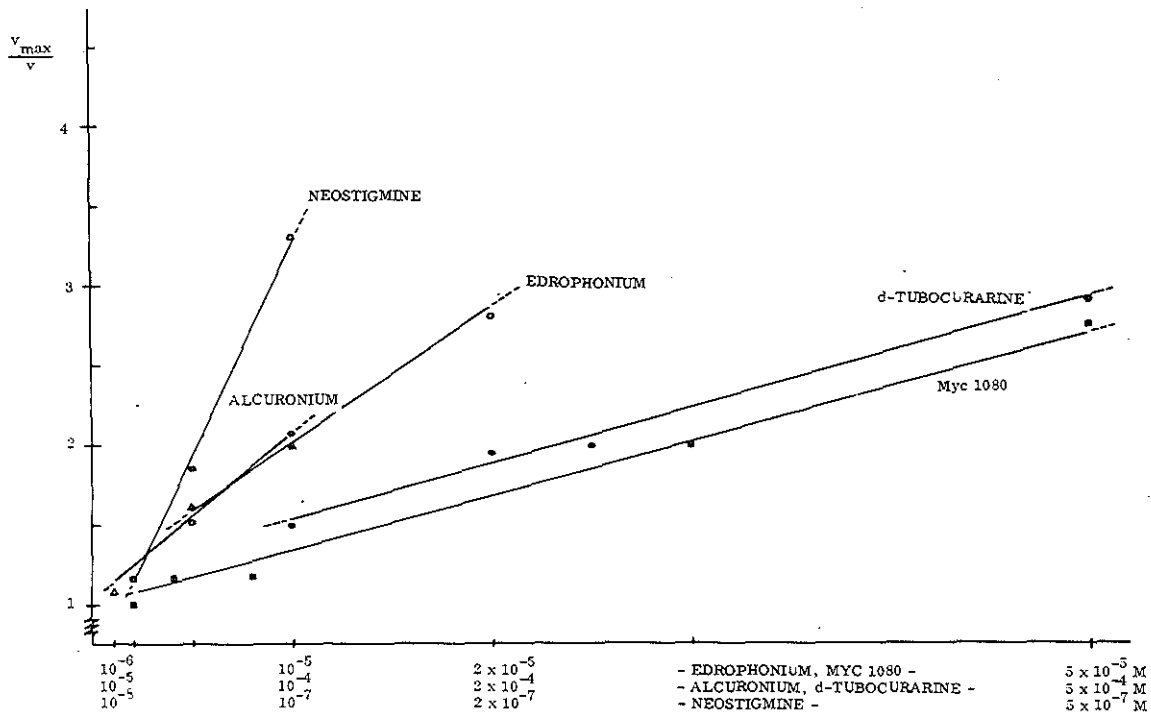


Fig. 28 - Remming van de activiteit van humane erythrocytencholinesterase als functie van de concentratie van enkele remstoffen in het reactiemengsel (let op de schaal van de abscis).

2.3.3. Discussie

De voor neostigmine gevonden waarde van $5,4 \times 10^{-8}$ ligt tussen de door Hobbiger (1) bepaalde waarde van $3,5 \times 10^{-8}$ en de door Levin en Jandorf (2) opgegeven waarde van $6,9 \times 10^{-8}$, alle gemeten aan humane erythrocytencholinesterase.

Hobbiger (1) vond voor edrophonium een I_{50} van 4×10^{-6} . De remming van acetylcholinesterase door Myc 1080 is dus 550 maal zo zwak als door neostigmine.

De dosering van Myc 1080 in vivo, die een met neostigmine vergelijkbare acetylcholinesteraseremming teweegbrengt, zal dus waarschijnlijk 550 maal zo hoog zijn als die van neostigmine. Deze laatste geeft al een duidelijke enzymremming - gemeten aan het antagonisme tegen d-tubocurarine en Myc 1080 - in een dosis van $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ neostigmine brengt een 90% relaxatie door Myc 1080 terug tot 45%). Men mag dus verwachten, dat een acetylcholinesteraseremming door Myc 1080 in vivo begint op te treden bij $550 \times 5 \mu\text{g}/\text{kg} = 2,75 \text{ mg}/\text{kg}$.

Bij een andere benadering komt men tot ongeveer dezelfde slotsom: spuit men i.v. een dosis van $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$ Myc 1080 (d.i. de RD_{90}), dan verdeelt deze zich in eerste instantie uitsluitend over de extracellulaire vloeistof (ECF), die 20% van het lichaamsgewicht uitmaakt. De concentratie daarin bedraagt dan $0,5 \text{ mg}/200 \text{ ml} = 1/400 \text{ mg}/\text{ml}$.

Het moleculairgewicht van Myc 1080-jodide is ongeveer 500, zodat de molariteit in de ECF $1/500 \times 1/400 = 5 \times 10^{-6}$ bedraagt.

(1) Hobbiger, F., cit. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Vol. XV (1963), 391.
 (2) Levin, A.P. & Jandorf, B.J., Handb. der Exper. Pharmakologie, Vol. XV (1963), 400.

De I_{50} in vitro bedraagt 3×10^{-5} . Hieruit volgt, dat in vivo het acetylcholinesterase voor 50% geremd zal zijn bij $6 \times RD_{90} = 3 \text{ mg/kg}$.

Men mag dus concluderen, dat de remming van de neuromusculaire overdracht door Myc 1080 in lagere doseringen niet berust op remming van acetylcholinesterase. Bij hogere doseringen gaat cholinesteraseremming een toenemende rol spelen. Dit zal op de eindplaatremming geen merkbare invloed hebben, evenmin op de remming van de muscarine-receptoren, omdat in vitro de anti-muscarine-werking van Myc 1080 ongeveer even sterk is als zijn eindplaatremmende werking (Hoofdstuk VIII). In de synapsen ligt de zaak ongunstiger, want hoewel de verhouding tussen ganglionblokkerende en eindplaatremmende werking in vitro 1,74 bedraagt, is zij in vivo ongeveer 5 (Hoofdstuk VIII). Het is dus heel goed mogelijk, dat de marge tussen ganglionblokkerende en acetylcholinesteraseremmende, dus ganglionstimulerende, dosis klein is, zodat bij hogere doseringen wel degelijk een dualistische werking verwacht mag worden, die door de anti-muscarine-werking van Myc 1080 zich uitsluitend zal manifesteren als een sympathomimetische.

Conclusie

Uit alle in dit hoofdstuk verzamelde gegevens blijkt duidelijk, dat Myc 1080 zonder enige twijfel behoort tot de competitief werkende, niet-depolariserende eindplaatremmers.

HOOFDSTUK VIII

BIJWERKINGEN

1. Histamine-vrijmaking

Van d-tubocurarine is sedert 1939 (1) bekend, dat het histamine kan vrijmaken en wel, naar wij thans weten, uit mastcellen. Dit kan onaangename gevolgen hebben in de zin van een bronchoconstrictie, vooral bij patienten die reeds bronchusafwijkingen hebben, zoals asthmapatienten. Een ander gevolg is een bloeddrukdaling, ofschoon deze zeker niet uitsluitend aan histamine-vrijmaking geweten kan worden. De bloeddrukdaling wordt, zoals reeds in Hoofdstuk I is opgemerkt, door sommige anesthesisten niet als een ongewenste bijwerking gezien, omdat de chirurg om bloedverlies tegen te gaan graag bij een verlaagde bloeddruk opereert. Dit neemt niet weg dat het farmacologisch gezien beter is om, als men een verlaagde bloeddruk wenst, deze met een speciale bloeddrukverlagende stof onafhankelijk regelbaar in de hand te houden.

Histamine-vrijmaking kan men op velerlei wijzen aantonen (2). Wij hebben ons tot drie methoden beperkt. Als referentiestof werd d-tubocurarine gebruikt.

1.1. Meting van de toeneming van de weerstand in de luchtwegen van cavia's volgens de methode van Konzett en Rössler (3)

Proefopzet

Met de opstelling, zoals schematisch weergegeven in fig. 29, wordt bereikt, dat de druk in de luchtwegen van de cavia's, bij elke inspiratie teweeggebracht door de pomp, steeds gelijk is aan 9 cm waterdruk. De overmaat door de pomp ingeblazen lucht komt terecht in een volumenschrijver, die deze overmaat registreert.

Wanneer bronchoconstrictie optreedt neemt de hoeveelheid lucht, die bij gelijkblijvende waterdruk door de longen kan worden opgenomen, af. Omdat het slagvolumen van de pomp gelijk blijft, komt dus meer lucht in de volumenschrijver, hetgeen resulteert in grotere uitslagen. Tijdens uitademing ontsnapt de lucht overmaat in de volumenschrijver langs de membraan van de tamboer, die tijdens de inspiratie de buis naar de volumenschrijver afgesloten hield. De mate van bronchoconstrictie wordt uitgedrukt in cm toeneming van de schrijfhoogte.

Het gewicht van de cavia's varieerde tussen 400 en 700 gram. De dieren waren geanestheiseerd met urethaan of pentobarbital i.p. Een Starlingpomp leverde een slagvolumen, groot genoeg om een redelijke overflow te waarborgen.

(1) Alam, M., Anrep, G.V., Barsoum, G.S., Talaat, M. & Wieninger, E., J. Physiol., 95 (1939), 148.

(2) Paton, W.D.M., Pharmacol. Rev., 9 (1957), 269.

(3) Konzett, H. & Rössler, R., Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 195 (1940), 71.

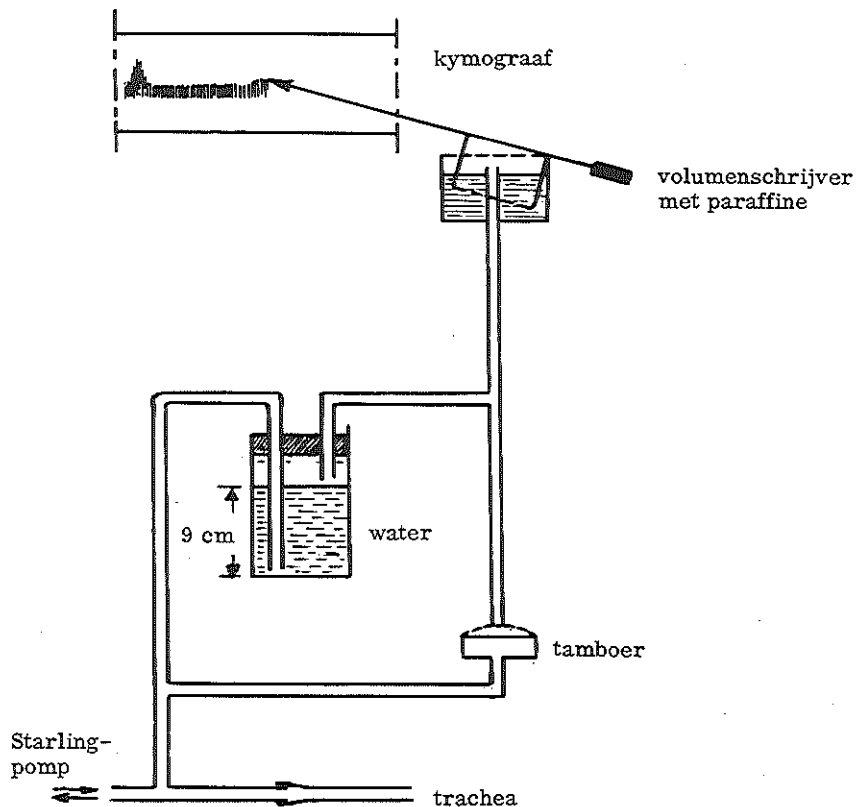


Fig. 29 - Schema van de proefopstelling volgens Konzett & Rössler

Om "tegenademen" tegen te gaan worden de cavia's verlamd met een eindplaatremmer. Deze werd in onze proeven weggelaten, omdat de onderzochte stoffen zelf eindplaatremmers zijn. Als referentiestoffen dienden d-tubocurarine en histamine.

De stoffen werden in de eerste proeven toegediend met tussenpozen van 30 minuten om de histaminedepots gelegenheid te geven zich weer te vullen. Later werd dit interval verlengd.

Doseringen:

Myc 1080	1,25	2,5	5	10	20	mg/kg i. v.
d-tubocurarine		2,5	5	10	20	mg/kg i. v.
histamine				7,5	10	μ g/kg i. v.

Resultaten

Myc 1080

Bij 6 cavia's bleek geen der gebruikte doseringen (5, 10 en 20 mg/kg) enig teken van histamine-vrijmaking te vertonen, terwijl histamine 7,5 μ g/kg een uitslagvergroting gaf van $28 \pm 1,15$ mm. Dit is naar onze ervaring ongeveer de maximaal bereikbare bronchoconstrictie.

d-Tubocurarine

Vijf van de acht cavia's reageerden met een bronchoconstrictie leidend tot een uitslagvergroting die varieerde tussen 2,5 en 26,0 mm na 10 mg/kg.

Op een dosis van 20 mg/kg reageerden zes van de acht cavia's met een uitslagvergroting van 2,5 tot 30,5 mm.

Neo-benodine^R (4-methyl-diphenhydramine-HCl) 0,2 mg/kg i.v. kon het d-tubocurarine-effect in alle gevallen geheel voorkomen.

Een en ander is geïllustreerd in fig. 30.

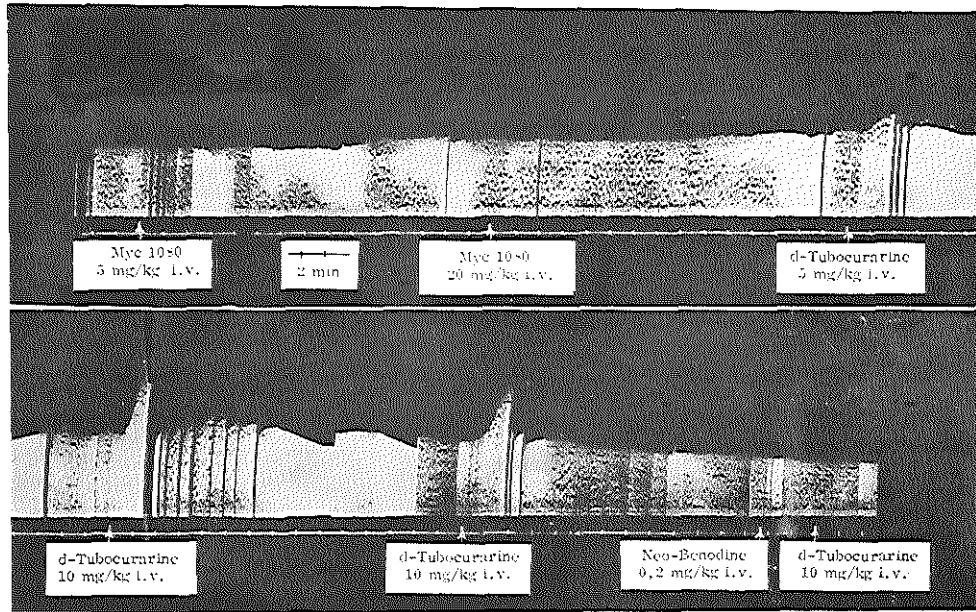


Fig. 30 - Meting van histamine-vrijmaking volgens Konzett & Rössler. Veranderingen in de overflow (cm) onder invloed van enkele onderzochte stoffen.

1.2. Methode van Fawcett (1)

Deze methode bestaat uit het intraperitoneaal injiceren van de in 20 ml Tyrode opgeloste, op histamine-vrijmaking te onderzoeken, stof bij ratten. Na 30 minuten wordt de resterende vloeistof weer opgezogen uit de peritoneaalholte en onderzocht op histaminegehalte. De hoeveelheid vrijgemaakte histamine werd bepaald in vitro met behulp van de geïsoleerde caviadarm.

Compound 48/80, d-tubocurarine en Myc 1080 in 20 ml Tyrode werden i.p. gespoten. Na opzuigen werd 0,4 ml toegevoegd aan het orgaanbad (20 ml) en werd gemeten het % van de maximaal met histamine bereikbare contractie van de caviadarm. Resultaat:

<u>Stof</u>	<u>dosis</u> (mg/kg i.p.)	<u>% contractie caviadarm</u> 0,4 ml in orgaanbad	<u>antagoneerbaarheid</u> <u>met Neo-benodine</u>
Cpd. 48/80	0,1	40	+
d-tubocurarine	1,0	30	+
Myc 1080	100	25	+

Met enig voorbehoud kan dus gezegd worden, dat Myc 1080 op mg-basis ongeveer een 100 x zo zwakke histamine-liberator is in deze proef als d-tubocurarine (3 proeven).

(1) Fawcett, D.W., J. Exp. Med., 100 (1954), 217.

1.3. Intracutane injectie bij de mens

De hiervoor gebruikte methode is ontleend aan de praktijk van Dr. A. Dragten, huidarts te Delft.

Myc 1080 en d-tubocurarine werden in naar eindplaatremmende werking equipotente doseringen intracutaan op de onderarm ingespoten bij 10 vrijwilligers. Als controle werden gebruikt een isotone neutrale fosfaatbuffer en een histamine-oplossing.

Alle injecties werden in één arm gegeven in een volumen van 0,1 ml.

Doseringen:

Myc 1080	- 10	μ g/0,1 ml
d-tubocurarine	- 5	μ g/0,1 ml
histamine	- 0,001	μ g/0,1 ml
fosfaatbuffer	- 0,1 ml	

Parameter: ernst van de zwelling 20 minuten na de injecties, uitgedrukt in -, +, ++ en +++.

Resultaten

<u>Proefpersoon</u>	<u>Myc 1080</u>	<u>d-tubocurarine</u>	<u>histamine</u>	<u>controle</u>
H.M.	-	+	+ / ++	-
T.B.	-	++	++ / +++	-
P.J.	-	+	+	-
C.G.	-	+	+ / ++	-
H.V.	-	++	++	-
C.V.	-	+	+ / ++	-
F.S.	+	+	-	-
F.Sch.	-	+	+	-
K.J.	-	+	+ / ++	-
P.E.	-	+	+	-

Bij proefpersoon F.S. zijn waarschijnlijk de histamine- en de Myc 1080-injecties verwisseld. Voor het overige mag men stellen, dat d-tubocurarine wél en Myc 1080 geen histamine-vrijmaking in de huid teweegbrengt.

1.4. Conclusie

Myc 1080 maakt geen histamine vrij in de huid van de mens of in de bronchi van de cavia en een zeer geringe hoeveelheid in de peritoneaalholte van de rat.

2. Marge tussen eindplaatremmende en ganglionblokkerende werking

2.1. In vitro

Bepaald werden de pA_2 - en pD_2 -waarden met het M.-rectus-abdominis-preparaat van de kikker met als agonisten succinylcholine voor de eindplaatremmende en nicotine voor de ganglionblokkerende werking, resp. volgens de methode van Ariëns et al. (1) en Van Rossum en Ariëns (2).

(1) Ariëns, E.J., Van Rossum, J.M. & Simonis, A.M., *Arzneim.Forsch.*, 6 (1956), 282.
(2) Van Rossum, J.M. & Ariëns, E.J., *Arch.Int.Pharmacodyn. Ther.*, 118 (1959), 447.

Resultaten

	<u>Myc 1080</u>		<u>d-tubocurarine</u>	
	<u>pA₂</u>	<u>pD'₂</u>	<u>pA₂</u>	<u>pD'₂</u>
eindplaatremmend	6,10	4,52	6,51	4,49
ganglionblokkerend	6,34	4,46	6,71	-

Hieruit volgt, dat in deze modellen de verhouding tussen de competitieve ganglionblokkerende en eindplaatremmende werking voor Myc 1080 bedraagt antilog $(6,34 - 6,10) = 1,74$ en voor d-tubocurarine antilog $(6,71 - 6,51) = 1,59$.

2.2. In vivo

Bij enkele katten werden simultaan geregistreerd de contracties van de M. tibialis anterior na prikkeling van de N. peroneus en die van de membrana nictitans na preganglionaire prikkeling van het ganglion cervicale superius. De dosisverhouding werd bepaald, waarbij 50% reductie optrad van de contractiehoogte van beide spieren. De prikkel op de N. peroneus bestond als gewoonlijk uit enkelvoudige supramaximale rechthoekige prikkels met een duur van 0,4 msec en een frequentie van 4 per minuut. De prikkel op de sympathicus werd gevormd door faradische supramaximale rechthoekige prikkels van 1 msec en een frequentie van 100 per seconde, telkens gegeven gedurende 3 sec, 1 maal per minuut.

Doordat de dosis-werkingscurven ongeveer parallel liepen, kon een activiteitsverhouding gemakkelijk worden geschat. Deze varieerde in 3 proeven tussen 3,5 en 8. Dit stemt goed overeen met de eerder gevonden verhouding tussen de dosis, waarbij juist hemodynamische effecten van betekenis beginnen op te treden, en de RD₉₀ (zie tabel 4 en 5). Het simultaan optreden van hemodynamische effecten en ganglionblokkade werd ook geconstateerd door Busfield et al. (1) met NN-dimethylconessine (= Myc 1001).

Terzijde zij vermeld, dat proeven bij de rhesusaap, die verder niet beschreven zullen worden, een ander beeld te zien gaven. De RD₉₀ bedroeg hierbij ongeveer 0,2 mg/kg. Kortdurende bloeddrukstijgingen begonnen op te treden bij 100 x RD₉₀ en langdurige dalingen bij 1000 x RD₉₀.

3. Invloed op speeksel- en bronchiaalsecreties

In Hoofdstuk VII werd aangetoond, dat Myc 1080 behoort tot de competitief werkende niet-depolariserende eindplaatremmers. Verder werd gevonden (dit hoofdstuk, paragraaf 2), dat de stof een ganglionblokkerende werking bezit. Proeven met de geïsoleerde rattedarm toonden aan, dat Myc 1080 een zwakke anti-muscarine-werking heeft: pA₂ = 5,94 ; SD = 0,10, d.i. ongeveer 1000 x zo zwak als atropine (pA₂ = 8,9). Deze waarde ligt in de grootte-orde van die van de eindplaatremmende werking, gevonden bij de M. rectus abdominis van de kikker (pA₂ = 6,10, Hoofdstuk VII, paragraaf 2.2.), m.a.w. de marge tussen beide werkingen is slechts klein, een factor 1,5 (voor d-tubocurarine is die factor 20).

Uit deze drie gegevens mag worden geconcludeerd, dat de stof in supramaximale eindplaatremmende doseringen een remmende invloed zal hebben op de speeksel- en bronchiaalsecreties. Gericht onderzoek op de bijwerking hypersecretie kon dan ook gevoegelijk achterwege blijven.

(1) Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G.,
Brit.J.Pharmacol., 32 (1968), 609.

4. Cumulatie

Om een indruk te krijgen van de snelheid van eliminatie, verrichtten we enkele proeven bij honden, waarin constante doseringen van Myc 1080 werden gegeven met vaste tussenpozen. Verlenging van de T_{50} werd beschouwd als indicatie voor cumulatie. Als dosis werd gebruikt de in een kort voorproefje bepaalde RD_{90} .

Proef 1

Aan een vrouwelijke hond van 14 kg werd 10 maal met een interval van 30 minuten i.v. Myc 1080 gegeven in een dosis van 0,6 mg/kg (= RD_{90}). De T_{50} was en bleef 5 minuten.

Proef 2

Herhaling van de proef bij een mannelijke hond van 8 kg met een dosis van 0,5 mg/kg (= RD_{90}), 14 maal i.v. gegeven met een interval van 15 minuten, leverde als resultaat, dat de T_{50} gedurende de eerste 6 toedieningen niet veranderde ($T_{50} = 4$ min.). Tussen de 6e en 7e maal werd pentobarbital bijgespoten, omdat de anesthesie te licht werd. Na de hierop volgende injecties fluctueerde de T_{50} rondom 7 min. Vrij zeker is de interactie met pentobarbital de oorzaak van de verlengde T_{50} .

Uit deze proeven volgt, dat de eliminatie van Myc 1080 snel is en dat cumulatie in lagere doseringen niet te vrezen is. Nadere gegevens over de snelheid waarmee Myc 1080 wordt geëlimineerd zijn verkregen met radioactief gemerkt Myc 1080 (Hoofdstuk X).

5. Invloed op de osmotische weerstand van de erythrocyten

Zoals gezegd, is het denkbaar dat een kwaternaire ammoniumbase met een grote lipofiele groep een dusdanige oppervlaktespanning-verlagende werking heeft, dat de osmotische weerstand van de erythrocyten erdoor zou kunnen worden verminderd. Een dergelijke bijwerking is uiteraard ongewenst.

Hierop gerichte proeven werden uitgevoerd, nadat in een toxiciteitsonderzoek siderose van de lever was gevonden. Deze siderose zou immers verklaarbaar kunnen zijn uit verhoogde bloedafbraak.

Het uitgevoerde onderzoek leidde evenwel niet tot enige indicatie voor verlaagde osmotische resistentie.

De proeven zijn beschreven in Hoofdstuk IX.

6. Hormonale bijwerkingen

Het lijkt niet erg waarschijnlijk, dat een sterk polaire stof zoals Myc 1080 nog werkingen zou bezitten, overeenkomend met de lipofiele natuurlijke steroidhormonen. Als er al zodanige werkingen zouden zijn, dan zullen ze bij de eenmalige klinische toepassing waarschijnlijk geheel wegvallen tegen de langer aanhoudende invloeden op het hormoonsysteem van de patient tengevolge van zijn ziekte en de stress van anesthesie en operatie.

Daarom werd besloten geen proeven te doen met Myc 1080, gericht op hormoonwerkingen, ook omdat het lang niet eenvoudig is dergelijke proeven te doen met een stof, die bij elke toediening beademing en anesthesie vereist. Deze omstandigheden maken een goede interpretatie van de resultaten trouwens moeilijk, zo niet onmogelijk.

Om toch een indruk te krijgen, werd volstaan met het maken van vagina-uitstrijkjes bij de vrouwtjes en het wegen en histologisch onderzoeken van de organen waarop steroidhormonen aangrijpen in drie weken durende toxiciteitsproeven met ratten.

De resultaten zullen worden besproken in Hoofdstuk IX.

7. Onderzoek naar placenta-passage

Bij sectio caesarea kan het gewenst zijn de spieren van de moeder met een motorische-eindplaatremmer te verslappen. Het is daarbij hoogst ongewenst, dat van die stof zoveel de placenta passeert, dat de baby met ademhalingsmoeilijkheden te kampen krijgt.

Daarom was onderzoek naar de placenta-passage bij proefdieren aangewezen.

De mens bezit een hemo-choriale placentatie. Deze treft men ook aan bij de aap. Dit dier is voor deze proeven evenwel weinig geschikt, omdat het moeilijk is vrouwtjesapen in gevangenschap te laten bevruchten en daarbij nog het juiste tijdstip van de geboorte te voorspellen. Ofschoon de placentatie bij ratten, katten en honden verschilt van die van de mens, moest worden volstaan met passageproeven bij deze drie species.

7.1. Proefopzet

Zwangere dieren werden zo dicht mogelijk à terme per sectio caesarea verlost onder lumbaal anesthesie (2% lidocaine) en kunstmatige beademing. Steeds werden eerst één of twee jongen verlost zonder Myc 1080 om de levensvatbaarheid te onderzoeken. Daarna werd aan de moeder Myc 1080 gegeven in een hoge dosering (5 mg/kg). Tenslotte werden de andere jongen met tussenpozen uit de uterus verwijderd. De jonge ratjes werden gegeven aan een moederdier, dat kort tevoren spontaan geworpen had en waarvan de eigen jongen waren verwijderd. Bij katten en honden werd dit niet gedaan. Hier zorgden de moeders voor hun eigen jongen.

7.2. Resultaten

<u>Proefdier</u>	<u>Verlost vòòr Myc 1080</u>		<u>Verlost tijdens Myc 1080</u>	
	<u>overlevend</u>	<u>overleden</u>	<u>overlevend</u>	<u>overleden</u>
rat 1	2	0	11	1
2	1	1	10	0
3	1	0	9	0
4	1	0	5	1
kat 1	1	0	1	0
2	0	1	1	1
3	1	0	1	1
hond 1)	1	0	1	3
2	1	0	4	1

*) de moeder weigerde de jongen te verzorgen.

In alle gevallen kwamen de jongen goed ademend en bewegend ter wereld.

De niet-overlevende dieren stierven niet door primaire ademstilstand, maar door andere oorzaken, zoals het verwerpen door de moeder, inhalatie van vruchtwater, e. d.

Tenslotte werd tijdens sectio van een hond Myc 1080 in de navelstreng van 6 pups gespoten in verschillende doseringen, om te zien hoe gevoelig de diertjes waren voor de stof. Het bleek, dat ademstilstand begon op te treden vanaf 0,2 mg/kg. De pups leken dus ongeveer 2-4 maal zo gevoelig voor de stof als volwassen, niet zwangere honden ($RD_{90} = 0,4 - 0,6$ mg/kg).

Omdat niet gelijktijdig van het moederdier de RD_{90} is bepaald, is een definitieve uitspraak over het verschil in gevoeligheid tussen pasgeboren en volwassen honden nog niet mogelijk.

7.3. Conclusie

Bij rat, kat en hond passeert Myc 1080 de placenta-barrière in het geheel niet of in hoeveelheden, die geen zichtbare invloed hebben op ademhalingspijeren en andere dwarsgestreepte spieren of op de overlevingskansen van de per sectio geboren jongen.

Bij proeven met Myc 1080-C¹⁴ (Hoofdstuk X) werd gevonden, dat de placenta van ratten à terme uiterst geringe hoeveelheden van die stof doorlaat.

Admiraal (persoonlijke mededeling) toonde aan, dat ook bij de mens de placenta-passage van Myc 1080 zeer gering is.

HOOFDSTUK IX

TOXICOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN

1. Inleiding

De stap van proefdier naar de mens wordt overwogen, wanneer van een potentieel nieuw geneesmiddel bekend zijn de hoofdwering en zowel de acute bijwerkingen, die de hoofdwering kunnen begeleiden, als de chronische, d.w.z. die toxische nevenwerkingen, die bij eenmalige toediening niet blijken, zoals geringe beschadiging van vitale organen (1).

Meestal wordt de humane toepassing in twee fasen ondernomen. Allereerst wordt de stof onderzocht op gezonde vrijwilligers met trapsgewijs oplopende doseringen. Hierbij gaat het erom wat eerst verschijnt: de hoofdwering of de bijwerkingen. Het is dus nodig nauwkeurige analyses te doen van alles wat maar enigszins mogelijk is, d.w.z. volledig lichamelijk, en, als daartoe aanleiding is, ook geestelijk onderzoek.

De hoofdwering zal men bij gezonde vrijwilligers niet altijd kunnen vaststellen, bijvoorbeeld die van pijnstillers, antibiotica, cardiotonica, antiaritmica, antitumorstoffen. In zulke gevallen moet men volstaan met het zoeken naar doseringen, waarbij verwachte en eventueel onverwachte bijwerkingen optreden. Blijken deze laatste niet te worden gevonden en is de dosis waarbij voorspelbare bijwerkingen worden gevonden bekend, dan is de stap naar de kwetsbare patient meer verantwoord.

In het algemeen wordt vòòr de vrijwilligersproef een toxicologisch onderzoek verricht bestaande uit dagelijkse toediening aan proefdieren, rat en hond, gedurende tenminste 6 weken en vòòr de eerste klinische proeven gedurende tenminste 3 maanden.

De aard en de duur van de toxicologische onderzoeken die noodzakelijk zijn voordat men in diverse landen tot registratie van het nieuwe geneesmiddel kan overgaan, worden bepaald door vele factoren, waarvan de voornaamste gememoreerd mogen worden.

Voor een overzicht met motivering van de gangbare toxicologische onderzoeken in de farmaceutische industrie zij verwezen naar Frohberg (2), Baker en Davey (3), en Hanley et al. (4). Verder wijdt Noach (5) enige behartigenswaardige beschouwingen aan de risico's, de verantwoordelijkheid en de wettelijke aansprakelijkheid van de experimentator, die de proeven op de mens verricht.

Het ligt voor de hand, dat stoffen die levenslang worden gegeven (b.v. antidiabetica) langer en uitgebreider toxicologisch moeten worden onderzocht dan stoffen die slechts één of enkele malen in het leven worden gebruikt (anesthetica, motorische-eindplaatremmers).

Ook de wijze van toediening speelt een rol. Zo zullen in het algemeen stoffen voor uitwendig gebruik (in zalven en lotio's) minder kans geven op systemische bijwerkingen dan dezelfde stoffen inwendig gebruikt; oraal toegediende stoffen die niet worden geresorbeerd, moeten an-

(1) Dollery, C.T. & Davies, D.S., Brit. Med. Bull., 26 (1970), 233.

(2) Frohberg, H., Pharm. Ind., 32 (1970), 1.

(3) Baker, S.B. de C. & Davey, D.G., Brit. Med. Bull., 26 (1970), 208.

(4) Hanley, T., Udall, V. & Weatherall, M., Brit. Med. Bull., 26 (1970), 203.

(5) Noach, E.L., International Symposium on Clinical Pharmacology, Brussels (1970), 34.

ders beoordeeld worden dan stoffen die intraveneus worden gespoten.

Er spelen echter ook overwegingen van geheel andere aard een rol.

Voor een in de diervroeven goed werkend cytostaticum zal men geneigd zijn meer risico's van bijwerkingen te nemen en dus minder toxiciteitsonderzoek te eisen, teneinde de ten dode gedoemde patient zo spoedig mogelijk een kans te geven met het nieuwe geneesmiddel.

Het is voor de farmaceutische industrie economisch niet verantwoord potentiële therapeutica voor zelden voorkomende ziekten geheel volgens de geldende eisen te ontwikkelen. Men zal in zulke gevallen toch kunnen helpen door in overleg met de registratie-commissies na beperkte toxiciteitsproeven, onder streng gecontroleerde voorwaarden de bruikbaarheid van de stof bij de patient te onderzoeken.

Voorts is van belang de vraag of er kans bestaat, dat zwangere vrouwen met de stof behandeld zullen worden. In dat geval heeft men met twee wezens te doen, waarvan de één volwassen en de ander in embryonale of foetale ontwikkeling is.

Beperken we ons niet tot geneesmiddelen alleen, dan spreekt de vraag naar de toepassing van de stof een woordje mee. Toevoegingen aan levensmiddelen om deze een smakelijker aanzien te geven (b.v. nitrieten op vlees) moeten strenger beoordeeld worden dan stoffen die door vergroting van de houdbaarheid de kans op het ontstaan van bacteriële of andere toxinen verkleinen (b.v. pimaricine op levensmiddelen voorkomt het schimmelen en verkleint daarmee de kans op vorming van o. a. de sterk hepatotoxische aflatoxinen).

Cosmetica vervullen een uiterst gewichtige sociale functie. De eisen hieraan gesteld steken wel magertjes af tegen die welke gesteld worden aan geneesmiddelen. De huid is een orgaan, dat o. a. een barrière vormt tegen schadelijke invloeden van buiten af. Beschadiging van deze barrière, ook al is die anatomisch niet of nauwelijks aantoonbaar, is niet acceptabel.

Voor crèmes, zalven of lotio's, te gebruiken voor de zieke huid, gelden toxicologische eisen, die - ten onrechte - (nog) niet gesteld worden aan schoonheidscrèmes, zonnebrandoliën e. d.

Bij de vaststelling welke toxicologische onderzoeken zullen worden gedaan, kan er verschil van mening bestaan tussen de onderzoekers die de stof hebben ontwikkeld en het Registratie College. Die meningsverschillen kunnen in sommige landen, waaronder Nederland en Engeland*), door overleg worden opgelost. In de U.S.A. is dit moeilijker.

Voor de industrie is het niet altijd eenvoudig de onderzoeken zo op te zetten en uit te voeren, dat zij voor de registratie-colleges van alle landen waar men de stof wil "brengen" aanvaardbaar zijn. Als we bovendien in aanmerking nemen de protectionistische voorschriften van sommige landen, dat toxiciteits- en/of klinische proeven in die landen zelf herhaald moeten worden, dan is het duidelijk dat internationale harmonisatie dringend nodig is om de reeds sterk geslonken stroom van nieuwe geneesmiddelen niet geheel te doen opdrogen.

Aan de andere kant moet worden toegegeven, dat van de "extrapolation to man" nog niet veel zinvols te zeggen is. Uit een vergelijkende retrospectieve statistische analyse van het onderzoek naar zes verschillende farmaca bij rat, hond en mens bleek, dat met chronische proeven bij de genoemde twee diersoorten slechts 62% van de bij de mens optredende bijwerkingen gevonden waren (1).

Met andere woorden, het is nog niet mogelijk toxiciteitsonderzoek bij proefdieren uit te voeren dat ons volledig inzicht geeft in alle te verwachten bijwerkingen bij de mens. Met al ons streven naar veiligheid bestaat daarom nog steeds een kans op calamiteiten zoals het Softenon-gebeuren. Deze is echter aanzienlijk kleiner geworden als gevolg van de hoge eisen, gesteld aan het onderzoek naar en, daarmee samenhangend, de hoge ontwikkelingskosten van nieuwe geneesmiddelen. Dit laatste heeft bovendien tot gevolg, dat het aantal nieuwe farmaca dat jaarlijks op de markt wordt gebracht sterk is afgenomen: in de U.S.A. in de loop van 10 jaar tot 10%.

*) Over "The role of the Committee on Safety of Drugs", zie: Mansel-Jones, D., Brit. Med. Bull., 26 (1970), 257.

(1) Litchfield, J. T., J. Amer. Med. Ass., 177 (1961), 104.

Door veel gebundelde ervaring zal in de loop der jaren de voorspelbaarheid waarschijnlijk langzaam groter worden. Hiermee zal het aantal soorten proefdieren vrij zeker geleidelijk aan toenemen. Immers, de verschillen in toxiciteit van een stof in verschillende species worden voor een belangrijk deel bepaald door verschil in eliminatie (chemische omzettingen, excretie). Er is geen diersoort bekend, die alle stoffen op dezelfde wijze verwerkt als de mens. Wel hoopt men door meer kennis van het metabolisme van de mens en van vele diersoorten zover te komen, dat voor het onderzoek van een potentieel nieuw geneesmiddel een proefdier kan worden gekozen, dat die stof behandelt op een wijze die zo goed mogelijk overeenkomt met de wijze waarop de stof in het menselijk organisme wordt verdeeld, omgezet en geëlimineerd (1, 2, 3, 4). Daarvoor is het nodig in een zo vroeg mogelijk stadium van toxicologisch onderzoek na te gaan, hoe de mens de stof omzet en uitscheidt.

Met de bijgezochte species kunnen dan uitgebreider toxiciteitsproeven worden verricht. Dit zou de extrapolatie naar de mens met meer zekerheid mogelijk maken. Hier dient de vraag zich aan, of het toelaatbaar is met slechts beperkte toxiciteitsgegevens de mens bloot te stellen aan de risico's die hieraan kunnen zijn verbonden. Deze risico's dient men af te wegen tegen de gevaren die inherent zijn aan elke overgang van proefdier naar de mens, zelfs nadat bij het proefdier uitgebreid toxicologisch onderzoek is verricht, waaruit een bedrieglijk gevoel van veiligheid is verkregen.

Om de veiligheid te verhogen zullen lage doseringen moeten worden gecombineerd met een groot onderscheidingsvermogen van de analyses. De proeven bij vrijwilligers dienen als het enigszins mogelijk is in een kliniek te geschieden, waar permanent deskundig toezicht aanwezig is, terwijl alle denkbare mogelijkheden van ingrijpen, als er iets mis mocht gaan, ter beschikking moeten staan.

Dit alles is gemakkelijker opgeschreven dan uitgevoerd. De technische problemen bij zo'n vroegtijdig onderzoek bij de mens zijn legio. Kwantitatieve bepaling van de stof en van zijn metabolieten als functie van de tijd in bloed, urine, faeces, en liefst ook nog in allerlei organen zoals de lever, na een veilige, dus lage dosis, zal met verfijnde methoden moeten geschieden. Deze moeten gedeeltelijk nog worden ontwikkeld.

Het ophelderen van de structuur van eventuele metabolieten is bovendien lang niet altijd een eenvoudige zaak. Dat neemt niet weg, dat het nuttig is in deze richting verder onderzoek te verrichten teneinde een beter inzicht te verkrijgen in de overdraagbaarheid van resultaten bij proefdieren op de mens.

Tenslotte nog enige opmerkingen over het begrip "biological availability".

Met deze term wordt aangeduid de mate, waarin een geneesmiddel uit zijn toedieningsvorm beschikbaar komt voor de ontplooiing van zijn werking.

Elk geneesmiddel wordt in een bepaalde farmaceutische vorm gegoten, er wordt een pil, een capsule, een injectievloeistof e.d. van gemaakt. De praktijk heeft herhaaldelijk bewezen, dat de excipientia, die hierbij gebruikt worden, maar ook andere factoren, zoals pH, kristalgrootte, hardheid van tabletten, oplos- of suspensiemiddel etc., de werkzaamheid van de stof in vivo op onvoorspelbare wijze sterk kunnen beïnvloeden, zowel in negatieve als in positieve zin. Zo bleken bij een vergelijkend onderzoek de bloedspiegels van verschillende in de handel zijnde tetracyclines na orale toediening van merk tot merk zeer uiteenlopend te zijn, zowel wat piekwaarde als wat duur betreft (5). J.L. Lach memoreerde tijdens een symposium van de European Society for the Study of Drug Toxicity in Berlijn (1971) o.a. de verrassende vondst, dat de biological availability van dicoumarine-tabletten kleiner was geworden nadat de tabletten - om ze gemakkelijker in stukken te kunnen breken - door de fabrikant groter waren gemaakt. Ook Ariëns (6) noemt een aantal treffende gevallen, waaruit blijkt dat de farma-

(1) Liljestrand, A., Proc. Europ. Soc. Study Drug Tox., Vol. XI (1970), 51.

(2) Baker, S.B. de C., Proc. Europ. Soc. Study Drug Tox., Vol. XI (1970), 52.

(3) Noel, P.R.B., Proc. Europ. Soc. Study Drug Tox., Vol. XI (1970), 57.

(4) Udall, V., Proc. Europ. Soc. Study Drug Tox., Vol. XI (1970), 70.

(5) Blair, D.C., Barnes, R.W., Lincoln-Wildner, E. & Murray, W.J., J. Amer. Med. Ass., 215 (1971), 251.

(6) Ariëns, E.J., Ned. Tijdschr. Geneesk., 113 (1969), 1774.

ceutische vormgeving bijzonder belangrijk is voor de werking.

De consequentie is, dat elk preparaat onderzocht zou moeten worden op biological availability. Natuurlijk is men in het verleden met vele preparaten al door scha en schande wijs geworden. Toch lijkt het onontkoombaar, dat overgeschakeld moet worden op zoveel mogelijk preparaten van bekende werkzaamheid, toxiciteit, houdbaarheid en nauwkeurig bekende samenstelling. Hieraan dienen volgens de wet de verpakte geneesmiddelen te voldoen. Naast de verpakte geneesmiddelen, waarvoor de wetgever de grootst mogelijke waarborgen ten aanzien van veiligheid en werkzaamheid eist, worden door de apotheker echter nog twee andere categorieën van geneesmiddelen afgeleverd. De eerste wordt gevormd door de z.g. ministeriële geneesmiddelen of nummerpreparaten. Deze categorie is lange tijd door de wet buiten beschouwing gelaten. Nadat zich met deze preparaten enige ernstige calamiteiten hadden voorgedaan, was de wetgever gedwongen ook voor deze categorie van massaal geproduceerde geneesmiddelen zij het minder sluitende (de Registratie Commissie heeft er h.v. geen bemoeienis mee) beveiligende voorschriften te geven. De tweede categorie bestaat uit de door de apotheker zelf bereide geneesmiddelen. Deze vallen buiten elke overheidscontrole. Het gebruik hiervan dient dan ook uit een oogpunt van volksgezondheid beperkt te blijven tot het strikt noodzakelijke.

Noch de deskundigheid van de apotheker, noch het compositorisch vernuft van de voorschrijvende arts kan een garantie zijn voor de werkzaamheid en de veiligheid van op magistrale wijze geconcipeerde geneesmiddelen.

Een compleet toxicologisch onderzoek, afgezien van onderzoek naar het metabolisme van de stof, omvat achtereenvolgens bepaling van de acute toxiciteit (LD_{50} -bepalingen), de subchronische (tenminste 3 weken) en de chronische toxiciteit (3 maanden tot 2, zelfs tot 10 jaar), alsmede generatie- en teratologische proeven.

Welke toxicologische onderzoekingen zijn nu nodig voor een kwaternaire motorische-eindplaatremmer van het niet-depolariserende type, waarvan uit metabolisme-onderzoekingen met de radioactief gemerkte stof de verdeling en eliminatie bekend zijn?

Een acuut toxiciteitsonderzoek in de zin van een LD_{50} -bepaling is zinloos. Immers, bij deze stof is de hoofdwerking (spier- dus ademverlamming) tevens de letale werking. De LD_{50} is hier niets anders dan de dosis, die bij 50% van de dieren een dodelijke ademstilstand geeft. Uit dosis-werkingsproeven onder kunstmatige beademing bij verschillende diersoorten was de RD_{90} reeds bekend. Het percentage dieren dat sterft door een partiële verlamming neemt toe naarmate de verlamming sterker en dus langduriger is. Het is daarom te verwachten dat de gevonden LD_{50} niet veel zal verschillen van de RD_{50} , in vivo bepaald in het spierzenuwpreparaat van dezelfde diersoort.

Omdat echter het Dunlop Committee (tegenwoordig Scowen Committee) deze proeven vroeg, hebben wij met enige tegenzin bij muizen de LD_{50} toch maar bepaald. Om te voorkomen dat de dieren bij vol bewustzijn zouden stikken, werden zij gedood op het moment dat ademstilstand optrad.

Een meer zinnige vorm van acuut toxiciteitsonderzoek is het op zo breed mogelijke schaal onderzoeken van hematologische, chemische, histologische en cardiologische veranderingen bij honden na een eenmalige toediening van lage tot zeer hoge doseringen tijdens kunstmatige beademing.

Omdat om technische redenen (kunstmatige beademing + anesthesie) de proefgroepgrootte gelimiteerd moest blijven, hadden we met deze proef bij honden alléén geen vrede en hebben we gepoogd een proef bij ratten uit te voeren, waarbij de stof gedurende 3 weken dagelijks (behalve tijdens de weekeinden) intraveneus werd gegeven en waarbij uitgebreid hematologisch, chemisch en histologisch onderzoek werd verricht. "Gepoogd", want van een zuivere toxiciteitsproef kon niet worden gesproken, omdat de stoftoediening dagelijks moest geschieden onder kunstmatige beademing en algemene anesthesie, twee mogelijk vertroebelende factoren. Een proefduur van 3 weken leek voldoende, omdat de stof slechts gedurende operaties eenmalig wordt toegediend en de mens, gemiddeld, ten hoogste enkele malen in zijn leven een operatie ondergaat.

Terzijde zij nog vermeld dat de FDA voor een perifeer werkend spierrelaxans een toxiciteitsproef van 3 maanden (!) op honden eiste, een zinloze, want door de dagelijkse kunstmatige

beademing met anesthesie een onzuivere toxiciteitsproef.

Een drie-generatietest kwam helemaal niet in aanmerking, omdat het onmogelijk is de stof gedurende drie generaties dagelijks i.v. te geven.

Van een teratologisch onderzoek werd voorlopig afgezien, omdat de stof nauwelijks of in het geheel niet de placenta passeert. Nu is het wel mogelijk, dat vruchtbeschadigingen optreden door veranderingen in het moederlijke milieu (hormonen, vitamine-deficiënties), maar van dergelijke veranderingen is noch bij het farmacologische, noch bij het toxicologische onderzoek van Myc 1080 iets gebleken. Als er tijdens een operatie iets zou gebeuren met de vrucht, zou dat door te lang durende hypoxie van de moeder kunnen worden veroorzaakt, maar deze "teratologische werking" is dan aan de anesthesist en niet aan Myc 1080 te wijten. Men kan zich afvragen of Myc 1080 als steroidmolecule nog hormonoïde werkingen bezit. Ofschoon dit door het extracellulair blijven van de stof en door de aanwezigheid van een sterk basische groep niet erg waarschijnlijk leek, werd hiernaar toch enig onderzoek verricht door bij de 3 weken durende toxiciteitsproef het endocriene apparaat uitgebreid te inspecteren.

De hierna te beschrijven proeven zijn alle gedaan met de farmaceutische vorm van Myc 1080, hetgeen in het licht van bovenstaande beschouwingen ook in de rede ligt. De samenstelling van de oplossing in de gerede ampullen was als volgt:

Myc 1080	20 mg
citroenzuur	10,8 mg
tri-Na-citraat	20 mg
aqua ad	1 ml.

2. LD₅₀ bij muizen

2.1. Proefopzet

Proefdier: albino muis (Swiss, TNO).

Proefgroepgrootte: 10 per dosis.

Geslacht: mannetjes, 18-22 gram.

Doseringen: vanaf 1 mg/kg oplopend met een factor $\sqrt{2}$, totdat een dosis bereikt was waarmee alle muizen ademstilstand kregen.

Toedieningsweg: i.p.

Parameter: ademstilstand.

Berekening LD₅₀ volgens de grafische methode van Litchfield en Wilcoxon (1).

2.2. Resultaten

LD₁₀ = 1,58 (1,28-1,94) mg/kg

LD₅₀ = 2,07 (1,82-2,47) mg/kg

LD₉₀ = 2,69 (2,19-3,31) mg/kg

(1) Litchfield, J. T. & Wilcoxon, F., J. Pharmacol. Exp. Ther., 96 (1949), 99.

3. Toxiciteit van een eenmalige dosering onder bescherming van kunstmatige beademing

In deze proef bij honden werd alcuronium mee onderzocht om t.a.v. eventuele afwijkingen Myc 1080 te kunnen vergelijken met een reeds uitgebreid klinisch gebruikte stof. Dit was te meer nodig, omdat wij in de literatuur geen toxiciteitsonderzoek van deze of van een andere eindplaatremmer aantreffen.

3.1. Proefopzet

Proefdier: mannelijke en vrouwelijke beagles, 8,5 - 15 kg.

Proefgroepgrootte, doses en toedieningsweg:

Per dosis werden 2 mannetjes- en 2 vrouwtjeshonden gebruikt. Dit is weinig, maar omdat kunstmatige ademhaling met anesthesie nodig is, was het technisch niet uitvoerbaar meer dan 16 dieren ongeveer simultaan de stof toe te dienen. Daarom werd ook afgezien van blanco groepen, d.w.z. dieren, die wél kunstmatig beademd werden onder algemene anesthesie, die echter oplosmiddel kregen in plaats van de remstof. Wel dienden de dieren in de dosisgroepen als hun eigen blanco's in alle parameters, behalve uiteraard ten aanzien van de histologie.

De stoffen werden onder algemene anesthesie, zoals beschreven in Hoofdstuk V onder 3.2., intraveneus via de V. femoralis toegediend in de volgende doseringen:

Myc 1080	2,5 - 5 - 10 mg/kg
alcuronium	0,2 mg/kg.

De hoogste dosis Myc 1080 bedroeg dus 20 x de RD₉₀ en de alcuronium-dosis ongeveer 10 x.

Parameters:

- hematologie: erythrocyten, leucocyten, differentiaaltelling der leucocyten, hemoglobine, hematokriet en bezinking
- leverfunctieproeven
- urineonderzoek: eiwit, glucose, pH, sediment, bloed, bilirubine
- ECG
- macroscopisch en microscopisch onderzoek van de weefsels 6 weken na de toediening. Ook in dit opzicht wijkt de proef af van een normale toxiciteitsproef, waar de autopsie onmiddellijk na de laatste toediening verricht wordt. Uitstel van de autopsie bood evenwel de gelegenheid eventuele functiestoornissen (leverfuncties en ECG) in de tijd te vervolgen, terwijl eventuele weefselbeschadigingen gelegenheid kregen zich te herstellen. Bij de autopsie werd daarom speciaal gelet op restverschijnselen.

Procedure:

- | | |
|-------------|---|
| nacht 0 - 1 | : dieren zonder voedsel in stofwisselingskooien, waarin urine werd opgevangen |
| dag 1 | : BSP, enzymen, hematologie, analyse van de 's nachts opgevangen urine
ECG voor, tijdens en na toediening van Myc 1080 |
| dag 2 | : leverfunctietests |
| dag 8 | : ECG |
| dag 22 | : ECG |
| nacht 42/43 | : als nacht 0 - 1 |
| dag 43 | : leverfunctietests, hematologie, ECG,
onderzoek van de 's nachts opgevangen urine,
autopsie. |

Om goede en goed vergelijkbare ECG's te verkrijgen werden deze geschreven onder een lichte pentobarbital-anesthesie (30 mg/kg), zonodig versterkt met $N_2O/O_2 = 7:3$, 20 ml/kg, 20 slagen per minuut.

De plaats van de elektroden werd aangeduid met Oostindische inkt. Hierdoor was het mogelijk de elektroden steeds op dezelfde plaats aan te brengen.

3.2. Korte beschrijving van de bij bloed- en urineonderzoek gebruikte methoden

Hematologie:

- het aantal erythrocyten en leucocyten werd geteld met een Coulter Counter.
- het hemoglobinegehalte werd bepaald met de cyaanhemoglobinemethode volgens Zijlstra en Van Kampen (1).
- de hematokrietwaarde werd verkregen met een microhematokrietcentrifuge.
- de differentiaaltelling der leucocyten werd optisch verricht.
- de sedimentatiesnelheid van de erythrocyten werd bepaald volgens de micromethode van Lowarski (2).

Leverfunctieproeven:

- serum glutamic oxalacetic transaminase (SGOT) en serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) werden bepaald volgens de methode van Reitman en Frankel (3) met behulp van Biochemica Test Combination TC-R/S no. 15964.
- lactic acid dehydrogenase (LDH) werd in de eerste proeven bepaald volgens de methode van Wröblewski en Ladue (4) met behulp van de Boehringer test combinatie TC-G-1, Art.no. 15977; in latere proeven werd gebruik gemaakt van de methode van Cabaud en Wröblewski (5) met een Sigma test kit.
- totaal eiwit en albumine/globuline-ratio met behulp van een biureetreactie (totaal eiwit) en een globulineprecipitatie met alcoholische trichloorazijnzuuroplossing (6, 7, 8).
- totaal en direct serumbilirubine volgens Rutkowski en De Baare (9).
- alkalische fosfatase volgens Sigma Technisch Bulletin (10), gebaseerd op Bessey et al. (11).
- broomsulfaleïne-test (BSP):
90 seconden na intraveneuze injectie van 10 mg/kg BSP-oplossing wordt bloed afgenomen en bepaald op BSP-concentratie volgens de door Henry et al. (12) gemodificeerde methode van Seligson (13).

Urine-onderzoek:

pH, eiwit, glucose en bloed werden bepaald met behulp van Labstix (Ames) en bilirubine met Ictotest (Ames). De pH is hierbij afleesbaar in gehele eenheden, de overige bepalingen zijn semikwantitatief.

- (1) Zijlstra, W.G. & Van Kampen, E.J., Clin.Chim.Acta, 5 (1960), 719.
Zijlstra, W.G. & Van Kampen, E.J., Clin.Chim.Acta, 6 (1961), 538.
Zijlstra, W.G. & Van Kampen, E.J., Clin.Chim.Acta, 7 (1962), 96.
- (2) in Gorter, E. & De Graaff, W.C., Klinische Diagnostiek, 15 (1947).
- (3) Reitman, S. & Frankel, S., Amer.J.Clin.Pathol., 28 (1957), 56.
- (4) Wröblewski, F. & LaDue, J.S., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 90 (1955), 210.
- (5) Cabaud, P.G. & Wröblewski, F., Amer.J.Clin.Pathol., 30 (1958), 234.
- (6) Debro, J.R., Tarver, H. & Korner, A., J.Lab.Clin.Med., 50 (1957), 728.
- (7) Kingsley, G.R., J.Biol.Chem., 137 (1939), 197.
- (8) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M., J.Biol.Chem., 177 (1949), 751.
- (9) Rutkowski, R.B. & De Baare, L., Clin.Chem., 12 (1966), 432.
- (10) Sigma Technisch Bulletin 104.
- (11) Bessey, O.A., Lowry, O.H. & Brock, M., J.Biol.Chem., 164 (1946), 321.
- (12) Henry, R.J., Chiamori, N. & Ware, A.G., Amer.J.Clin.Pathol., 32 (1959), 201.
- (13) Seligson, D., Merina, J. & Dodson, E., Clin.Chem., 3 (1957), 638.

3.3. Resultaten

Eén hond overleed door aspiratie van maaginhoud tijdens het opnemen van het ECG op dag 8.

Hematologie

Tabel 6 geeft de gemiddelde waarden van de proefgroepen vòòr en 6 weken na toediening van de stof.

Omdat praktisch alle waarden in de loop van het experiment verschoven blijken te zijn in een gunstige richting, was statistische evaluatie overbodig.

	dosis mg/kg	<u>Myc 1080</u>			<u>Alcuronium</u>	
		2,5	5	10	0,2	s*)
erythrocyten ($10^6/\text{mm}^3$)	dag 0	3,89	4,84	3,56	4,40	0,73
	6 weken	4,84	5,12	3,66	5,20	0,44
leucocyten (per mm^3)	dag 0	6100	6100	6500	6950	2030
	6 weken	7150	4200	5150	5900	1420
hemoglobine (g/100 ml)	dag 0	12,2	12,8	11,5	12,0	1,7
	6 weken	13,4	12,9	12,6	13,1	0,9
hematokriet (%)	dag 0	33,6	36,1	32,8	34,1	3,8
	6 weken	39,9	38,8	40,0	38,8	2,3
bezinkingssnelheid (mm)	dag 0					
	na 1 u	3,0	2,8	3,8	3,0	2,5
	na 2 u	11,0	5,8	8,2	8,0	7,3
	6 weken					
	na 1 u	2,2	3,0	4,7	2,8	2,5
	na 2 u	5,8	7,8	11,0	7,0	6,6

*) s = standaarddeviatie tussen de dieren binnen de doseringsgroepen.

Tabel 6 - Gemiddelden van bij het hematologische onderzoek verkregen waarden vòòr en 6 weken na i.v. injectie van Myc 1080 bij honden. Referentiestof: alcuronium.

In tabel 7 worden de waarden vermeld (in %), gevonden bij de differentiaaltelling der leucocyten. Er werden steeds 200 cellen geteld.

De getallen geven hier evenmin aanleiding tot het uitvoeren van een statistische analyse.

Hematologisch zijn blijkens beide tabellen geen toxische invloeden aantoonbaar.

Leverfunctieproeven

Dooreen foutieve behandeling van de bloedmonsters zijn deze bepalingen mislukt. Dit noopte tot een aanvullende, op eventuele veranderingen in de leverfuncties gerichte proef (zie punt 4).

Urineonderzoek

De individuele bevindingen staan vermeld in tabel 8.

Hierbij moet nog worden aangetekend, dat de urine van de dieren uit de 10 mg/kg groep werd opgevangen in een metabolismekooi, terwijl die van de andere proef-dieren werd verkregen door katheterisatie. Dit verklaart de aanwezigheid van bloed in de urine van sommige van deze laatste.

De bevindingen wijzen niet op een toxische invloed van Myc 1080 of van alcuronium.

		<u>Myc 1080</u>			<u>Alcuronium</u>
dosis mg/kg		2,5	5	10	0,2
eosinofiel	dag 0	6,0	6,5	6,0	6,5
	6 weken	4,5	5,5	6,0	11,0
basofiel	dag 0	0,4	0,2	0,1	0,2
	6 weken	0,2	0,4	0,2	0,1
staafkernig	dag 0	1,1	3,3	2,1	1,5
	6 weken	1,7	3,2	2,7	1,5
segmentkernig	dag 0	71	72	74	60
	6 weken	75	71	69	58
myelocyten	dag 0	0	0	0	0
	6 weken	0	0	0	0
lymfocyten	dag 0	15	13	12	24
	6 weken	12	14	17	21
mononucleair	dag 0	5,5	5,0	5,0	8,0
	6 weken	6,0	6,0	5,0	7,5

Tabel 7 - Differentiaaltelling der leucocyten vòòr en 6 weken na i. v. injectie van Myc 1080 bij honden. Referentiestof: alcuronium.

s/g	<u>pH</u>			<u>eiwit</u>			<u>glucose</u>			<u>blood</u>			<u>bilirubine</u>			<u>sediment</u>		
	v	24	6w	v	24	6w	v	24	6w	v	24	6w	v	24	6w	v	24	6w
	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1	e 1
Myc 1080	♀	7	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5 mg/kg	♀	7	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♂	7	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♂	7	7	7	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Myc 1080 5 mg/kg	♀	7	8	8	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	♀	6	7	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	±	+	+	-
	♂	6	6	7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	±	+	+	-
Myc 1080 10 mg/kg	♀	7	7	7	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	7	6	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	♂	6	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
alcuronium 0,2 mg/kg	♀	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	6	6	6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♂	7	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
♂	7	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
♂	9	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-

v = vòòr injectie
24 = 24 uur na injectie
6w = 6 weken na injectie

- = negatief
+ = positief

sediment: e = erythrocyten
l = leucocyten
. = gering
+ = talrijk

Tabel 8 - Urineonderzoek bij honden vòòr en 6 weken na i. v. toediening van Myc 1080. Referentiestof: alcuronium.

ECG

Dr. Roos omschrijft zijn bevindingen bij de analyse van de individuele ECG's als volgt:

"De veranderingen in het ECG, die in enkele honden gevonden werden, bestaan uit T-top-veranderingen in de zin van repolarisatiestoornissen. In enkele gevallen werd eveneens een geringe ST-depressie waargenomen. Zulke veranderingen werden ook gezien in de ECG's van alcuronium-honden. Zij worden in het algemeen toegeschreven aan een geringe mate van anoxie van de hartspier.

Ritme- of geleidingsstoornissen werden niet gezien.
De stof lijkt niet primair toxisch voor het hart te zijn."

De meeste veranderingen werden gezien in de 5 mg/kg groep van Myc 1080 en in de alcuroniumgroep. De door Dr. Roos beschreven afwijkingen waren als volgt verdeeld over de verschillende proefgroepen (4 proefgroepen van 4 proefdieren; per dier 4 ECG's op verschillende tijdstippen; één hond stierf tijdens de proef): 2,5 mg/kg groep 3 x, 5 mg/kg groep 11 x, 10 mg/kg groep 1 x en alcuroniumgroep 7 x. Totaal zijn 60 ECG's geschreven en beoordeeld.

Autopsie

Dr. Schornagel vat de bevindingen van het macroscopische en microscopische onderzoek samen als volgt:

"De enige duidelijke bevinding is de siderose in de stercellen van de lever. Dit kan wijzen op een verhoogde bloedafbraak. Ik heb geen ervaring over de hoeveelheid ijzer, die normaal in de levers van blanco honden voorkomt. De met Myc 1080 behandelde honden hadden mogelijk wat meer ijzer in de stercellen dan de alcuronium-honden. Incidentele bevindingen waren bijvoorbeeld wormen, infiltraatjes in nieren en hartspier. Eén dier had een lichte enteritis."

De door Dr. Schornagel gevonden siderose zou een gevolg kunnen zijn van hemolyse, die op haar beurt weer verklaard zou kunnen worden uit het kwaternaire karakter van de toegediende verbindingen. Een alternatieve verklaring zou kunnen zijn, dat bij de vele venapuncties bloed uit de aangeprikte vaten nalekt, waardoor subcutaan hematomen ontstaan.

Toen uit beschouwing van de levers van onbehandelde honden geen siderose werd gevonden, werd daarom besloten hierop gerichte proeven te doen (punt 5).

Conclusie

Met de aantekening, dat de leverfunctieproeven mislukten, kan in het bovenstaande alleen de gevonden siderose als een mogelijk toxisch fenomeen worden aangemerkt. Om eventuele levertoxiciteit op het spoor te komen werden speciaal hierop gerichte proeven ondernomen.

4. Aanvullend leverfunctie-onderzoek

4.1. Proefopzet

Aan 6 mannelijke beagles, gewicht 9-12 kg, werd een eenmalige dosis van 5 mg/kg Myc 1080 i.v. gegeven onder dezelfde experimentele condities als vermeld onder 3, waarbij op verschillende tijdstippen leverfunctieproeven als beschreven onder 3.2. werden uitgevoerd.

4.2. Resultaten

De gemiddelden van de op diverse tijdstippen gevonden waarden staan, met de SE (= de standaarddeviatie van de waarnemingen, berekend uit de spreiding tussen de dieren), vermeld in tabel 9.

	<u>vòðr</u> <u>injectie</u>	<u>dag 1</u>	<u>dag 2</u>	<u>dag 4</u>	<u>dag 14</u>	<u>S.E.</u>
SGPT (I. U.)	8,8	12,5	9,3	8,8		1,9
SGOT (I. U.)	15,2	20,3	16,0	11,3		2,6
LDH (U.) *	34,4	33,5	35,2	47,7		19,4
<u>Alkalische fosfatase</u> (B.L.U.)	0,35	0,05	0,33	0,35		0,15
<u>Bilirubine</u> (mg/100 ml)	0,15	0,12			0,14	0,04
<u>Totaal eiwit</u> (g/100 ml)	5,8				6,0	
<u>Albumine/globuline-ratio</u>	0,91				1,20	0,14

*) volgens Wròblewski en LaDue

I. U. = International Units

B.L.U. = Bessey-Lowry Units

Tabel 9 - Resultaten van leverfunctieproeven vòðr en op verschillende tijdstippen na i. v. injectie van 5 mg/kg Myc 1080 bij honden.

Op de metingsresultaten werd een variantie-analyse uitgevoerd, waarbij de variantie-component tussen de metingstijdstippen (dagen) werd getest op de variantie tussen de dieren binnen de dagen. In geval van significante verschillen tussen de tijdstippen werd met behulp van de methode der lineaire contrasten onderzocht, op welke dagen de uitkomsten afweken van de uitgangswaarden.

Statistisch werden enkele significante verschillen gevonden, welke toxicologisch echter van geen belang zijn.

Zoals uit de tabel blijkt, kan van een nadelige beïnvloeding van de leverfuncties niet gesproken worden.

4.3. Conclusie

Na een eenmalige hoge dosering van Myc 1080 (5 mg/kg) zijn geen leverfunctiestoornissen aantoonbaar.

5. Aanvullend onderzoek op siderose

5.1. Bepaling van de osmotische weerstand van erythrocyten in vitro

De volgende proeven werden gedaan:

Myc 1080 (10 mg/ml) werd toegevoegd aan met EDTA onstolbaar gemaakt hondsbloed tot concentraties van respectievelijk 1, 3, 9, 27 en 81 mg/liter bloed.

Na goed doch voorzichtig mengen werden de bloedmonsters gedurende $\frac{1}{2}$ en 2 uur bewaard bij 37°C. Daarna werden ze gecentrifugeerd en het plasma spectrofotometrisch (extinctie bij 540 m μ) onderzocht op aanwezigheid van hemoglobine. De resultaten werden vergeleken met die van controlebloed, waaraan overeenkomstige hoeveelheden fysiologisch zout waren toegevoegd.

Resultaat: in geen der bloedmonsters werd hemolyse waargenomen.

De proef werd herhaald met een hogere dosis Myc 1080, nl. 2,5 gram/liter bloed en een bewaarduur van 1 uur.

Resultaat: zowel in de met Myc 1080 als in de met fysiologisch zout behandelde monsters werd een geringe hemolyse waargenomen. Deze is wellicht ontstaan door niet geheel zorgvuldige bewerking van de monsters.

Van hondbloed werd het plasma vervangen door 0,5% of 0,6% NaCl (hypotonisch dus), waarna aan een deel ervan Myc 1080 (10 mg/ml) werd toegevoegd tot concentraties van 1, 3, 9, 27 en 81 mg/liter "bloed". Hemolyse werd bepaald op de eerder beschreven wijze.

Resultaat: in geen der 0,6% NaCl bevattende erythrocytensuspensies trad hemolyse op, terwijl in alle 0,5% NaCl bevattende suspensies een lichte hemolyse aantoonbaar was, die kwantitatief niet verschilde van die in de controlesuspensies.

5.2. Bepaling van de osmotische weerstand der erythrocyten in vivo

Uit de proeven *in vitro* kon niet worden geconcludeerd dat Myc 1080 door grensvlakwerking of anderszins de fragiliteit van de erythrocyten verhoogde. De mogelijkheid was evenwel niet uitgesloten dat *in vivo* metaboliëten of andere onvoorspelbare factoren een rol zouden spelen. Daarom werd nog de volgende proef gedaan:

Aan twee beagles werd een enkele *i.v.* injectie gegeven van Myc 1080 in een hoge dosis van 5 mg/kg. Er werd bloed afgenomen vlak voor de injectie en na de injectie en wel bij hond I op de tijdstippen 10 minuten, 0,5 - 1 - 1,5 - 2,5 - en 3,5 uur na injectie en bij hond II 0,5 uur en 1 - 2 - 7 - 14 en 21 dagen na injectie. De osmotische weerstand van de erythrocyten werd bepaald volgens de methode beschreven in Gorter en De Graaff (1).

Resultaten: in tabel 10 staan vermeld de sterkten van de zoutoplossingen, waarbij de hemolyse juist begint (minimale extinctie) en die, waarbij de hemolyse juist maximaal is geworden (maximale extinctie).

	vòòr injectie	10 min.	0,5 u	1 u	1,5 u	2,5 u	3,5 u
<u>Hond I</u>							
min. extinctie	0,54	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
max. extinctie	0,40	0,38	0,38	0,38	0,38	0,40	0,38
<u>Hond II</u>		<u>0,5 h</u>	<u>1 d</u>	<u>2 d</u>	<u>7 d</u>	<u>14 d</u>	<u>21 d</u>
min. extinctie	0,50	0,56	0,50	0,50	0,52	0,50	0,50
max. extinctie	0,34	0,32	0,34	0,36	0,34	0,34	0,34

Tabel 10 - Verklaring, zie tekst.

Ook *in vivo* is dus geen invloed van Myc 1080 of zijn metaboliëten op de erythrocytenmembraan aantoonbaar.

5.3. Histologisch onderzoek naar siderose

Bij twee groepen van 3 beagles werden intraveneus de volgende oplossingen ingespoten: Myc 1080 5 mg/kg en alcuronium 0,2 mg/kg. Bij de inspuitingen werd zo goed mogelijk vermeden, dat subcutaan hematomen zouden ontstaan.

(1) Gorter, E. & De Graaff, W.C., *Klinische Diagnostiek* (1947) 6e ed., I, 12.

Een derde groep van eveneens 3 beagles kreeg s.c. 10 ml eigen bloed ingespoten om na te gaan of subcutane hematomen misschien de oorzaak waren van de siderose (zie punt 3. onder autopsie). Deze injectie werd 16 dagen later herhaald. Na 43 dagen (hetzelfde tijdsverloop als in de onder 3 beschreven proef, waarbij siderose werd gevonden) werd autopsie verricht en de lever microscopisch onderzocht (Fe-kleuring).

Dr. Schornagel vat zijn bevindingen samen als volgt:

" Er werden slechts minimale hoeveelheden ijzer in de levers gevonden, zulks in tegenstelling tot de grote hoeveelheden in de vorige proef. "

Conclusie

In vitro noch in vivo was het mogelijk de siderose, gevonden in de onder 3 beschreven proef, te verklaren of te bevestigen. Het was niet meer na te gaan wat dan wèl de oorzaak van de siderose was geweest. Verder onderzoek is achterwege gelaten.

6. Toxicologisch onderzoek bij ratten

6.1. Proefopzet

Proefdieren

Wistar-ratten van het Proefdiervermeerderingsbedrijf TNO. Gewicht 170-220 gram.

Behandelingsgroepen

Myc 1080	12 mg/kg (4 mg/ml - 0,3 ml/100 gram)	8 mannetjes + 8 vrouwtjes
Myc 1080	6 mg/kg (2 mg/ml - 0,3 ml/100 gram)	8 mannetjes + 8 vrouwtjes
Myc 1080	3 mg/kg (1 mg/ml - 0,3 ml/100 gram)	8 mannetjes + 8 vrouwtjes

Fysiologisch zout 0,3 ml/100 gram 8 mannetjes + 8 vrouwtjes.

Toedieningsweg: intraveneus in de staartvenen.

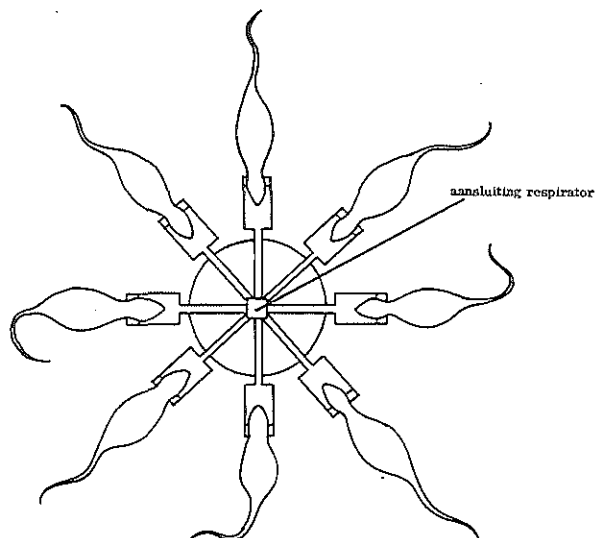
Procedure

De oplossingen werden toegediend tijdens kunstmatige beademing met een lachgas-zuurstof-mengsel (7 : 3), zulks om stress tengevolge van het gevoel van onmacht door de spiervlamming en van de kunstmatige beademing tegen te gaan. Tegen de tijd dat de stof uitgewerkt raakte, begonnen de dieren weerstand te bieden. Het N₂O/O₂-mengsel was blijkbaar niet in staat dit te voorkomen. Op dat moment waren de dieren echter nog onvoldoende in staat zelf te ademen. Daarom werd steeds gedurende 6 minuten nabeademd met 1% halothaan. Omdat de stoffen in de drie doseringsgroepen een verschillende werkingsduur hadden, varieerde de beademingsduur navenant, en wel van ca. 2 uur (Myc 1080 12 mg/kg) tot 6 minuten (fysiologisch zout).

Voor kunstmatige beademing werd de Keuskamp-kinderrespirator gebruikt. Deze werd aangesloten op een perspex blok, waarop circulair 8 beademingskamertjes waren aangesloten, zoals aangegeven in de figuur op de volgende bladzijde.

Duur van de proef

De proef werd gedurende 3 weken voortgezet, waarbij uitsluitend op werkdagen de stof werd gegeven, totaal 14 maal.



6.2. Parameters

Tijdens de proef:

- gedrag en sterfte
- gewichtstoename van de dieren
- vagina-uitstrijkjes gedurende de laatste 5 dagen.

Aan het eind van de proef:

- onderzoek van urine
- hematologisch onderzoek
- leverfunctie-onderzoek
- autopsie, waarbij speciale aandacht werd besteed aan mogelijke hormonale effecten van Myc 1080.

Vòòr de aanvang van de proef werden geen bepalingen gedaan waarvoor ingrepen, zoals bloedafname, nodig waren, om te vermijden dat hierdoor de betrekkelijk kortdurende proef, waarbij bovendien dagelijks ingrijpende handelingen werden verricht, te veel zou worden beïnvloed. Daarom werd alleen een vergelijking met een controlegroep uitgevoerd.

6.3. Resultaten

Gedrag en sterfte tijdens de proef

In het gedrag werden behalve de gevolgen van de anesthesie geen bijzondere afwijkingen geconstateerd.

Tijdens de dagelijkse toediening van de oplossingen onder kunstmatige beademing met lachgas-zuurstof, gevolgd door halothaan, stierven enkele dieren, deels door technische onvolkomenheden, deels door plotselinge recurarisatie nadat de dieren weer schijnbaar normaal waren gaan ademen, of door bloed of slijm in de luchtwegen. Omdat de hoogste dosisgroep steeds het eerste aan de beurt was, vielen hierin de doden door mechanische fouten. De sterfte in die groep is daardoor wat goter dan in de andere groepen:

	<u>Myc 1080</u> <u>12 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>6 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>3 mg/kg</u>	<u>Controle</u> -
♂♂	2	1	2	0
♀♀	5	2	2	3

Acht van de 17 doden vielen op de eerste dag. Hierna waren - achteraf bezien - de meeste moeilijkheden blijkbaar opgelost. Het aantal dieren waarop bepalingen verricht zijn, was dus uiteindelijk in de verschillende proefgroepen ongelijk. Dit betekent, dat in de evaluatie van de hierna te bespreken bevindingen de verschillende gemiddelden ongelijk gewogen zijn.

Toename van het lichaamsgewicht

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de gemiddelde gewichtstoename in grammen bij elk der proefgroepen.

	<u>Myc 1080</u> <u>12 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>6 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>3 mg/kg</u>	<u>Controle</u> -	<u>s*)</u>
♂♂	+ 4,7	+ 17,4	+ 31,7	+ 47,9	9,8
♀♀	- 11,3	- 9,2	- 9,0	- 6,8	5,7

*) s = standaarddeviatie binnen de behandelingsgroepen.

De resultaten werden statistisch geëvalueerd met behulp van een variantieanalyse, op beide geslachten afzonderlijk uitgevoerd. De totale variantie werd opgesplitst in een component, veroorzaakt door de behandelingen, en een component welke de gecombineerde spreiding binnen de behandelingsgroepen vertegenwoordigt. Deze variantiecomponenten werden met een F-toets onderling vergeleken. Deze procedure werd eveneens toegepast op de resultaten van de hematologie en van het leverfunctie-onderzoek.

Opmerkelijk is het geslachtseffect: alle mannetjes zijn in gewicht toegenomen, alle vrouwtjes afgenomen.

De groeiremmende invloed van Myc 1080 t.o.v. de controlegroep bij de mannetjes is duidelijk significant ($p < 0,001$). Het effect neemt met de dosis lineair toe.

De verschillen bij de vrouwtjes zijn niet significant ($p > 0,20$).

De interpretatie van deze bevindingen is niet eenvoudig, vooral omdat verzuimd werd het voerverbruik te meten.

Als gevolg van de dagelijkse behandeling, waarvan de anesthesie in de eerste plaats genoemd worden, was opgevallen, dat de dieren weinig aten; gedurende de weekeinden haalden zij de opgelopen achterstand enigszins in.

Daarom werd besloten een gerichte proef te doen met mannetjes- en vrouwtjesratten, nu wel met bepaling van het voerverbruik, waarbij werden vergeleken geheel blanco (dus onbehandelde) dieren, dieren die alleen met halothaan en kunstmatige ademhaling waren behandeld, en dieren die bovendien nog Myc 1080 hadden gekregen.

Deze proef zal worden beschreven onder punt 7. Daarna zal gepoogd worden de resultaten te interpreteren.

Urine-onderzoek

De urine werd verkregen door de dieren gedurende de laatste nacht van de proef individueel in stofwisselingskooien te plaatsen.

Glucose en bilirubine waren bij alle dieren negatief. Bij twee dieren werd enig bloed gevonden: bij één vrouwtje uit de 12 mg/kg Myc 1080-groep en bij één mannetje uit de 3 mg/kg Myc 1080-groep. Sporen eiwit werden bij de meeste dieren aangetroffen, maar dit is normaal voor ratten.

De pH leverde geen aanwijzingen voor verschillen.

Hematologisch onderzoek

Bloed werd afgenomen uit de plexus retroorbitalis en onderzocht op aantallen erythrocyten en leucocyten per mm³. Verder werden hemoglobine- en hematokrietwaarden bepaald.

De resultaten staan vermeld in tabel 11.

		12 mg/kg Myc 1080	6 mg/kg Myc 1080	3 mg/kg Myc 1080	Controle	s
<u>erythrocyten</u>	♂♂	7,50	7,69	7,30*)	7,60	0,18
(10 ⁶ /mm ³)	♀♀	7,09	7,25	7,17	7,41	0,25
<u>leucocyten</u>	♂♂	5790	4860	4950	6410	1165
(per mm ³)	♀♀	4650	6040*)	4270	3580	1310
<u>hemoglobine</u>	♂♂	16,0	15,8	15,2	15,5	0,57
(g/100 ml)	♀♀	13,8	14,3	14,3	14,5	0,72
<u>hematokriet</u>	♂♂	47,7	47,4	44,7*)	46,7	1,8
(%)	♀♀	41,2	42,3	41,7	41,9	1,9

*) significant afwijkend van overige groepen (P < 0,05).

Tabel 11 - Gemiddelden van bij het hematologisch onderzoek verkregen waarden na 3 weken toediening van Myc 1080 aan ratten onder anesthesie en kunstmatige beademing (s = standaarddeviatie binnen de doseringsgroepen).

De uitkomsten geven geen aanleiding tot de veronderstelling dat Myc 1080 enige invloed zou hebben op het bloedbeeld.

Leverfunctie-onderzoek

De in het serum gevonden enzymconcentraties staan vermeld in tabel 12.

Opgemerkt moet worden, dat de SGOT-waarden wat hoog zijn uitgevallen. Dit is mogelijk veroorzaakt door het feit, dat deze bepaling om organisatorische redenen één dag later werd uitgevoerd dan de twee andere enzymbepalingen. Het bewaren van het bloed heeft de SGOT-waarden waarschijnlijk verhoogd. Aan deze waarden mag dan niet te veel belang worden gehecht. Een andere mogelijkheid is, dat halothaan in alle groepen de SGOT-waarden gelijkelijk heeft verhoogd. In dat geval hebben deze hogere waarden wél betekenis, maar zijn zij geen indicatie voor een toxische werking van Myc 1080 wegens het ontbreken van een correlatie met de dosis. Ofschoon statistisch niet significant, valt er een minimale dosis-gecorrleerde verhoging van SGPT en alkalische fosfatase bij mannetjes op te merken. Desondanks is de conclusie gewettigd, dat de stof in de gebruikte doses geen merkbare invloed heeft gehad op de leverfuncties, voor zover gemeten aan de serumenzymen.

	Geslacht	Myc 1080	Myc 1080	Myc 1080	Controle	s
		12 mg/kg	6 mg/kg	3 mg/kg	-	
Aantal dieren (n)	♂♂	5	7	6	8	
SGOT (I.U.)	♂♂	70,4	75,0	68,5	83,2	20,8
SGPT (I.U.)	♂♂	18,7	17,1	15,8	15,8	3,4
Alk.fosfatase (B.L.U.**)	♂♂	13,7*)	11,4	9,0	8,6	3,7
Aantal dieren (n)	♀♀	3	6	6	5	
SGOT (I.U.)	♀♀	65,7	63,2	76,6	64,4	11,7
SGPT (I.U.)	♀♀	10,9*)	13,4	19,2	16,2	2,9
Alk.fosfatase (B.L.U.**)	♀♀	6,2	6,1	6,0	6,6	1,5

*) significant afwijkend van controle-gemiddelde (p < 0,05)

**) B.L.U. = Bessey Lowry Units

I.U. = International Units

Tabel 12 - parametergemiddelden en standaardafwijking (s) aan het slot van de proef bij de n overlevende proefdieren per dosis.

Hormonoïde werkingen

Zoals in de inleiding werd opgemerkt, moest om technische redenen worden volstaan met waarnemingen gedurende en aan het eind van dit 3 weken durende experiment. Twee aspecten werden bekeken:

vagina-uitstrijkjes gedurende de laatste 5 dagen

De periode van 5 dagen werd gekozen omdat dit ongeveer de duur is van een cyclus. Als Myc 1080 geen invloed heeft op de cyclus en dus waarschijnlijk niet op de secretie van oestrogenen en progesteron, moeten alle stadia in deze 5 dagen worden aangetroffen. Tabel 13 geeft een overzicht van de gevonden beelden.

	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5
Myc 1080 - 12 mg/kg	g/a a a	a a g	a a a	a a a	a g a
Myc 1080 - 6 mg/kg	a e g a a g/a	g g g/a a a g	g a a e a a	g a a e/g e a	a g/a a a g/a a
Myc 1080 - 3 mg/kg	a a g g a g	a a a a a g/a	e/g e a e a	g g a a g/a a	g a g a e a
Controle	a g a a a	a a a a a	e a g e e	g e e e g	g g e g a

a = anoestrus

e = pro-oestrus

g = oestrus

Tabel 13 - Vagina-uitstrijkjes gedurende de laatste 5 dagen van een 3 weken durend toxiciteitsonderzoek van Myc 1080 bij ratten.

Hieruit mag worden geconcludeerd, dat Myc 1080 geen noemenswaardige invloed heeft op de cyclus. De 12 mg/kg groep lijkt iets langer in anoestrus te zijn, maar hieraan behoeft niet veel waarde te worden gehecht.

Hormonaal profiel

Een indruk van de invloed op hypofyse, bijnier, primaire en secundaire geslachtsorganen verkrijgt men door weging van deze organen, eventueel gevolgd door microscopische inspectie.

Tabel 14 geeft een overzicht van de gemiddelde gewichten van de belangrijkste organen in de verschillende behandelingsgroepen.

	<u>Myc 1080</u> <u>12 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>6 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>3 mg/kg</u>	<u>Controle</u>	<u>s</u>
<u>VROUWTJES</u>					
uterus	0,312	0,382	0,435	0,356	0,104
ovaria	0,097	0,098	0,080	0,093	0,015
bijnieren	0,064	0,052	0,055	0,052	0,009
nieren	1,296	1,278	1,383	1,369	0,115
lever	6,240	6,128	5,968	5,532	0,470
milt	0,383	0,395	0,410	0,388	0,050
thymus	0,151	0,198	0,198	0,193	0,039
hypofyse	0,012	0,013	0,010	0,012	0,002
<u>MANNETJES</u>					
zaadblaasjes	0,385	0,392	0,468	0,456	0,083
M. levator ani	0,127	0,136	0,141	0,156	0,036
prostaat	0,188*)	0,207	0,254	0,242	0,040
bijnieren	0,036	0,036	0,042	0,039	0,006
nieren	1,609	1,589	1,720	1,619	0,163
lever	6,813	6,930	6,975	6,710	0,733
milt	0,481	0,405	0,546	0,461	0,088
thymus	0,285	0,270	0,289	0,298	0,064
hypofyse	0,007*)	0,007	0,009	0,008	0,001

*) significante relatie tussen dosis en orgaangewicht ($p < 0,05$).

Tabel 14 - Gemiddelde orgaangewichten (g) van ratten aan het eind van een 3 weken durend toxiciteitsonderzoek met Myc 1080 (s = standaarddeviatie).

Slechts het prostaatgewicht neemt dosisafhankelijk af onder invloed van Myc 1080 ($p < 0,05$). Parallel hiermee lijkt - het zij met enige reserve gezegd - het hypofysegewicht af te nemen.

Ofschoon statistisch niet significant, is er bij de vrouwtjes een indicatie voor een dosisafhankelijke toename van het levergewicht.

Voordat uit deze bevindingen conclusies getrokken worden, is het zinvol de relatieve orgaangewichten te berekenen, omdat het lichaamsgewicht nogal sterk beïnvloed is.

Tabel 15 vermeldt de orgaangewichten in % van het lichaamsgewicht.

Geen van de nu gevonden significanties lijkt te zijn veroorzaakt door Myc 1080. Wel is ook in deze tabel te zien, dat - hoewel statistisch niet significant - bij de vrouwtjes het levergewicht iets is toegenomen, maar er is geen dosiscorrelatie meer aanwezig. Deze geringe toename heeft overigens pathologisch geen betekenis, te minder daar de leverfunctieproeven bij de vrouwtjesratten geen afwijkingen opleverden en het microscopische beeld evenmin afwijkend was (zie Autopsie).

Hecht men in gevallen, waarbij het lichaamsgewicht sterk is beïnvloed, overwegend waarde aan de relatieve orgaangewichten, dan kan men concluderen, dat Myc 1080, een kwaternaire stikstof bevattend aminosteroid, zeer waarschijnlijk geen hormonoïde activiteit bezit.

	<u>Myc 1080</u> <u>12 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>6 mg/kg</u>	<u>Myc 1080</u> <u>3 mg/kg</u>	<u>Controle</u> <u>-</u>	<u>s</u>
<u>VROUWTJES</u>					
uterus	0,174	0,213	0,241	0,197	0,055
ovaria	0,054	0,055	0,045	0,052	0,008
bijnieren	0,036	0,029	0,030	0,029	0,006
nieren	0,722	0,715	0,766	0,756	0,060
lever	3,467	3,477	3,310	3,058	0,249
milt	0,215	0,221	0,227	0,210	0,027
thymus	0,084	0,111	0,110	0,106	0,022
hypofyse	0,007	0,007	0,006	0,007	0,001
<u>MANNETJES</u>					
zaadblaasjes	0,188	0,186	0,205	0,228	0,036
M. levator ani	0,062	0,065	0,061	0,073	0,014
prostaat	0,093	0,098	0,112	0,114	0,019
bijnieren	0,018	0,017	0,019	0,018	0,003
nieren	0,790	0,760	0,750	0,761	0,071
lever	3,347 *)	2,832	3,045	3,148	0,291
milt	0,236	0,193	0,236	0,216	0,033
thymus	0,140	0,129	0,127	0,139	0,029
hypofyse	0,003	0,003	0,004	0,004	0,0004

*) significant verschil tussen levergewicht van 6 en 12 mg/kg-groep.

Tabel 15 - Gemiddelde relatieve orgaangewichten (g) van ratten aan het eind van een 3 weken durend toxiciteitsonderzoek met Myc 1080 (s = standaarddeviatie).

Autopsie

Na het macroscopische onderzoek van de gebruikelijke organen, werden microscopische preparaten gemaakt van de hoogste dosisgroep en van de blanco groep. De organen van de lagere dosisgroepen werden bewaard om op indicatie alsnog te worden gesneden.

Dr. Schornagel vatte zijn bevindingen aldus samen:

"Ik heb de serie fraaie, zeer goed te beoordelen coupes bestudeerd van de proeven met Myc 1080 (254/256, 271/276, 290/294, 295/302).

Nergens heb ik duidelijke veranderingen gevonden, die als toxisch geduid zouden kunnen worden, alleen in 274 meen ik minimale, in ieder geval reversible veranderingen te hebben gezien in de lever.

Wel waren er duidelijke veranderingen in de longen van enkele dieren van de controlegroep, nl. 299, 300, 301 en 302. Hebben daar dieren bij elkaar gezeten of was hier iets bijzonders mee?

Hoewel de morfologische resultaten dus geen enkele toxische werking te zien hebben gegeven, moet men zich wel realiseren, dat de morfologie bij het onderzoek van deze curareachtige stof slechts uiterst beperkte waarde heeft."

6.4. Conclusie

Behalve onregelmatigheden in de lichaamsgewichten werden geen afwijkingen gevonden, die op een toxische werking van Myc 1080 duiden. De gevonden onregelmatigheden in het lichaamsgewicht dienen echter een punt van nadere studie te vormen. Hierover wordt gerapporteerd onder punt 7.

7. Aanvullend toxicologisch onderzoek op ratten

7.1. Proefopzet

De proef, beschreven onder 6, werd herhaald, zij het beperkt in de volgende opzichten.

- a) er werden 3 groepen met elkaar vergeleken en wel:
- Myc 1080 12 mg/kg i.v., 0,3 ml/100 gram, 10 ♂♂ + 10 ♀♀
 - controlegroep halothaan + kunstmatige ademhaling, 10 ♂♂ + 10 ♀♀
 - controlegroep fysiologisch zout zonder halothaan en zonder kunstmatige ademhaling, 10 ♂♂ + 10 ♀♀.
- b) als parameters werden uitsluitend gebruikt:
- sterfte
 - gewichtstoename
 - voedselverbruik.

7.2. Resultaten

Sterfte tijdens de proef

	<u>Myc 1080</u>	<u>Halothaan + K.A.</u>	<u>Controle</u>
♂♂	1	2	0
♀♀	4	1	0

De doodsoorzaak was in 2 van de 8 gevallen een te hoge dosis halothaan en in 3 gevallen recurarisatie.

Lichaamsgewicht en voerverbruik

De volgende tabel geeft een overzicht van de gemiddelde gewichtstoename en het gemiddelde voerverbruik in de proefperiode.

	<u>Myc 1080</u>	<u>Halothaan + K.A.</u>	<u>Controle</u>	<u>s</u>
<u>MANNETJES</u>				
gewichtstoename (g)	- 4,3	+ 21,6	+ 49,1	12,0
voerverbruik (g/rat/dag)	9,0	10,7	13,0	0,8
<u>VROUWTJES</u>				
gewichtstoename (g)	- 9,0	- 12,0	2,0	6,0
voerverbruik (g/rat/dag)	7,5	7,2	9,0	1,2

7.3. Bespreking van de resultaten

Wordt op lineaire schaal het voerverbruik uitgezet tegen de gewichtstoename, dan ontstaan rechte lijnen, zowel bij mannetjes als bij vrouwtjes (fig. 31). Hieruit valt te concluderen, dat de geremde eetlust de oorzaak is van de groeiremming.

Blijft de vraag, waardoor de dieren minder eten. Bij de mannetjes in de proef, beschreven onder 6., wordt een statistisch significante lineaire dosisafhankelijkheid van de gewichtstoename gevonden. Men zou dus kunnen concluderen, dat althans bij mannetjes Myc 1080 de eetlust dosisafhankelijk remt. Dit kan berusten op de ganglion-blokkerende en parasympholytische werking van Myc 1080. De hierdoor ontstane dosisafhankelijke darmparalyse met vertraagde ontleding zou oorzakelijke betekenis kunnen hebben. Toch moet ook nog de algemene anesthesie een rol gespeeld hebben,

omdat het verschil in voerverbruik tussen de met halothaan + kunstmatige beademing behandelde ratten en de blanco ratten aanzienlijk is.

In de onder 6. beschreven proef is de duur van de algemene anesthesie evenredig met de duur van de paralyse en deze is weer afhankelijk van de dosis Myc 1080, m. a. w. de eetlust kan dosisafhankelijk geremd zijn zowel door Myc 1080 (darmparalyse) als door het gebruikte anestheticum.

Bij de vrouwtjes liggen deze invloeden minder duidelijk, maar dezelfde trend is, ook in de proef onder 6. beschreven, toch wel aanwijsbaar.

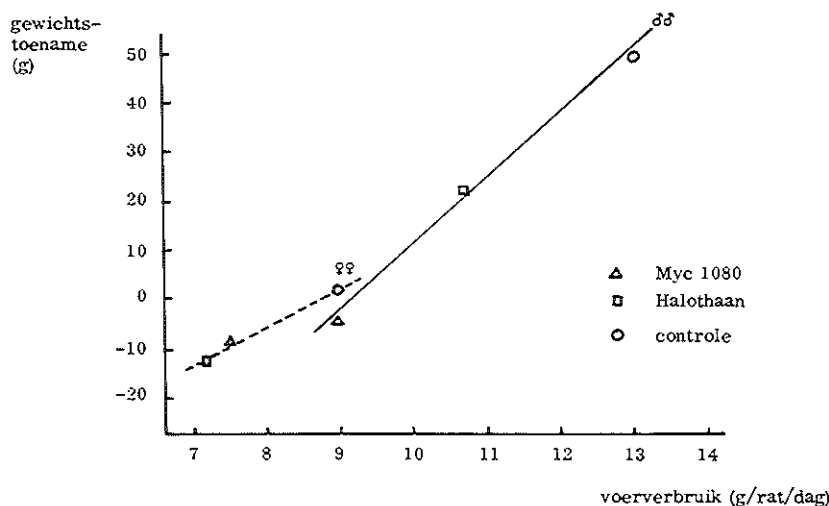


Fig. 31 - Verandering in het lichaamsgewicht van ratten als functie van het voerverbruik na een 3 weken durend onderzoek van Myc 1080 12 mg/kg i. v. in vergelijking met controlegroepen.

7.4. Conclusie

Uit deze proef is duidelijk geworden, dat de eetlust primair wordt geremd door halothaan-behandeling + kunstmatige beademing met als direct gevolg remming van de gewichtstoename van de ratten. Myc 1080 versterkt dit effect vooral duidelijk bij de mannetjes, hetzij door beïnvloeding van de noodzakelijke duur van de anesthesie, hetzij door een paralytische werking op de maag-darmtractus, hetzij door beide. Het is weinig waarschijnlijk dat de eetlustremming veroorzaakt wordt door een direct toxische werking van Myc 1080, te minder omdat geen andere afwijkingen werden gevonden die op een toxische werking van Myc 1080 wijzen.

8. Acute en subacute toxiciteit van ontledingsprodukten van Myc 1080

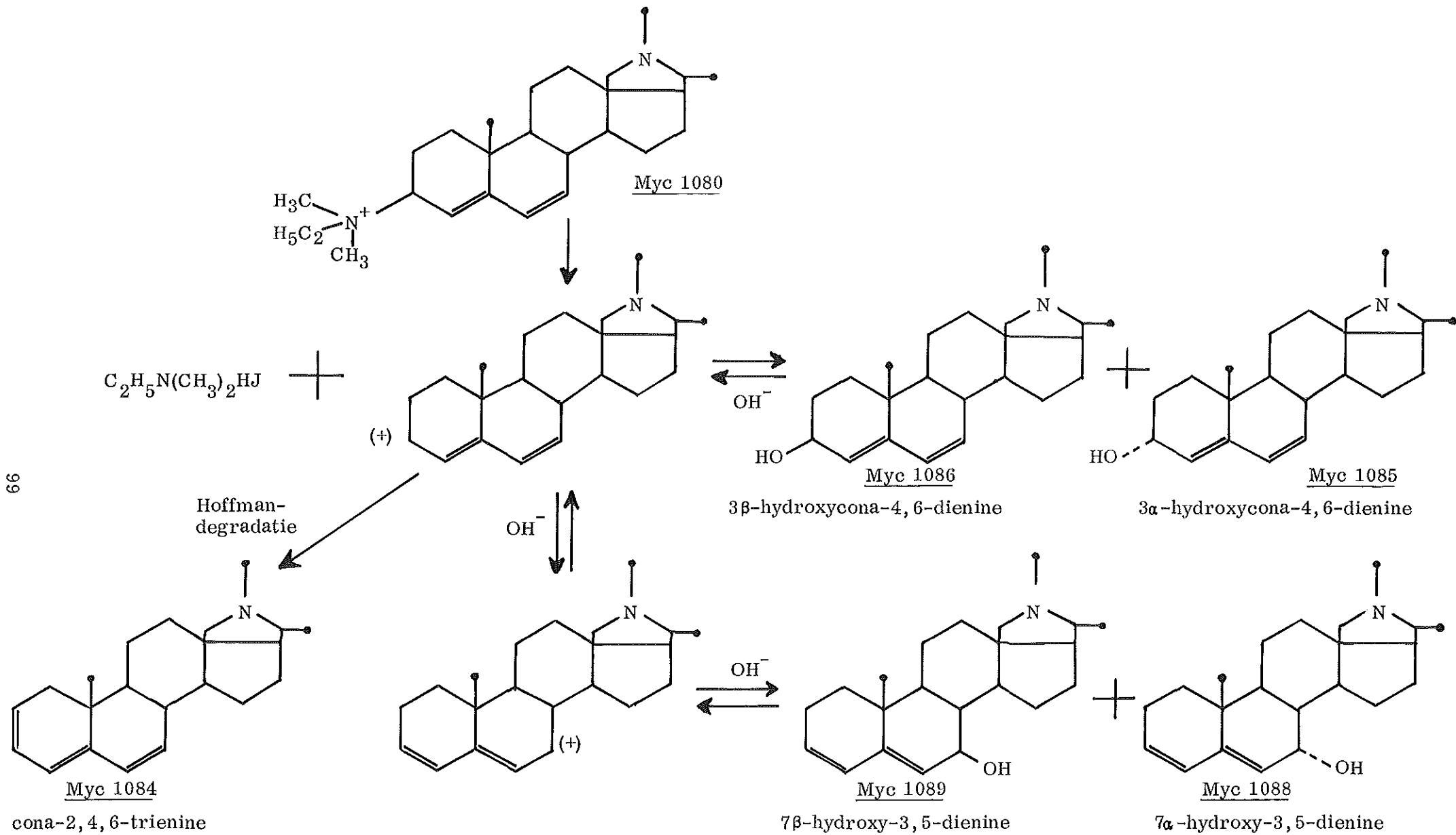
Voordat een farmaceutische bereidingsvorm wordt vrijgegeven voor klinisch onderzoek, moet hij voldoen aan een aantal eisen. Voor intraveneus toe te dienen preparaten gelden o. a. eisen ten aanzien van steriliteit, afwezigheid van pyrogenen en, evenals voor alle preparaten, de eis van stabiliteit.

De oplossing van Myc 1080 is wel steeds op steriliteit onderzocht, maar het testen op pyrogenen is wegens de speciale geaardheid van de stof nagelaten en vervangen door zorgvuldig filtreren door ultrafilters.

Er zijn weinig in water opgeloste preparaten die onbeperkt houdbaar zijn.

Ook van Myc 1080 bleek de houdbaarheid niet absoluut. In dat geval doet zich de vraag voor, wat de mogelijke toxiciteit van de afbraakprodukten is. Om die toxiciteit te kunnen bepalen, dient men eerst de structuur der afbraakprodukten vast te stellen.

Fig. 32 - Ontstaan van ontledingsprodukten uit Myc 1080.



Daarna moeten zij worden gesynthetiseerd en vervolgens onderzocht op toxiciteit. Bij lang staan bij kamertemperatuur of bij korter staan bij hoge temperaturen ontstaat een 5-tal afbraakprodukten. Door een Hoffman-degradatie ontstaat een trienine en door hydrolyse vier alcoholen, waarvan de structuren werden vastgesteld, zoals weergegeven op pag. 41 (fig. 32).

In zuur milieu vormen de vier hydroxy-verbindingen een evenwicht met elkaar. Myc 1089 is minder goed oplosbaar dan de andere drie. Myc 1084 is onoplosbaar. Na lange tijd zal daarom Myc 1084 ontstaan uit de andere afbraakprodukten en neerslaan.

Een neerslag in ampullen moet dus beschouwd worden als een teken van ontleding. Voor toxiciteitsproeven werden ampullen van Myc 1080 (in citraatbuffer) verhit in een silicone-oliebad van 100°C gedurende 24 uur. De inhoud werd afgefilterd en met dunnelaagchromatografie gecontroleerd op afwezigheid van Myc 1080. De heldere oplossing, waarin een mengsel van degradatieprodukten aanwezig is, werd gebruikt voor het acute-toxiciteitsonderzoek; voor het subacute-toxiciteitsonderzoek van het hele mengsel van ontledingsprodukten, dus zonder filtratie, werd een suspensie bereid in een door Dorfman (1) voor steroïden aanbevolen suspensievloeistof.

8.1. Acuté toxiciteit

Bij muizen werd de intraveneuze LD₅₀ bepaald op verschillende tijdstippen na verhitting. Het bleek, dat de toxiciteit in de loop van 4 weken steeg van LD₅₀ = 160 mg/kg tot LD₅₀ = 40 mg/kg. Daarna bleef deze waarde constant. Deze resultaten wijzen erop, dat in het mengsel verschuivingen optreden in de richting van een toxischer component. In vergelijking met de bij muizen bepaalde LD₅₀ van Myc 1080 van 2,06 mg/kg is de toxiciteit van de afbraakprodukten dus klein.

8.2. Subacute toxiciteit

Proefopzet

Een suspensie van ontledingsprodukten overeenkomend met 5 mg/kg Myc 1080, werd dagelijks gedurende 7 dagen i.p. ingespoten bij 4 mannelijke beagles van 7 - 12,5 kg. Bloed en urine werden onderzocht op de tijdstippen -7, -0, 1, 2, 4, 14 en 44 dagen na injectie.

Op dag 44 werden de dieren opgeofferd en de volgende organen macroscopisch en microscopisch onderzocht: longen, hart, lever, nier, bijniere, urineblaas, schildklier, galblaas, milt, pancreas, mesenteriale lymfklieren, maag, ileum, speekselklier, skeletspier, testes en prostaat.

Resultaten

Algemene bevindingen

Drie van de 4 honden kregen diarree na de eerste injectie en de vierde hond braakte. Deze verschijnselen werden niet meer gezien na de 6 volgende injecties.

Hematologie

De gemiddelden van de onderzochte parameters staan vermeld in tabel 16.

(1) Dorfman, R.I., Methods in Hormone Research, Vol. II (1962), 709.

	dag -7	dag -0	dag 1	dag 2	dag 4	dag 14	dag 44	S.E**)
erythrocyten ($10^6/\text{mm}^3$)	6,93	6,91	6,75	6,35*)	6,64	7,06	7,08	0,16
leucocyten (per mm^3)	9390	8280	15990*)	11130	9050	9530	11540	1978
segmentkernig (%)	49,5	45,6	61,0*)	51,5	45,3	42,6	61,0*)	6,03
lymfocyten (%)	38,3	44,9	26,8*)	35,9	41,0	44,5	30,5	0,56
eosinofiel (%)	4,1	4,1	6,5	4,8	6,8	6,1	4,4	-
basofiel (%)	0,1	0,2	0,0	0,4	0,5	0,9	0,0	-
staafkernig (%)	3,9	2,0	2,5	2,1	2,8	2,0	2,4	-
monocyten (%)	4,2	3,2	3,2	3,6	5,0	4,4	1,8	-
hemoglobine (mg/100 ml)	15,8	15,8	14,6*)	14,8*)	14,7*)	16,0	16,2	0,43
hematokriet (%)	48,4	50,5	46,6	46,3*)	43,3*)	48,5	49,0	1,32
bezinkingssnelheid (mm)								
na 1 uur	2,0	1,5	6,0	6,0	2,2	1,0	1,8	1,5
na 2 uur	4,2	3,2	15,5*)	13,8	5,8	2,5	4,5	3,6
stollingstijd (sec)	22,5	22,3	23,0	23,0	21,8	21,0	22,3	0,7
LDH (U.) ***)	63,8	61,3	53,8	72,5	140*)	52,5	73,8	26,6
alkalische fosfatase (B.L.U.)	0,68	0,68	0,98	0,78	0,73	0,60	0,48	0,15
SGOT (I.U.)	9,2	12,0	7,0*)	9,8	11,2	13,0	12,0	1,7
SGPT (I.U.)	16,2	14,0	24,2	23,5	17,5	14,2	11,0	10,1

*) significant verschillend van gemiddelde waarde vòòr injectie (toets van Dunnett, $\alpha = 0,05$ tweezijdig).

**) Standard Error of the mean ($\frac{S}{\sqrt{n}}$).

- niet normaal verdeeld.

***) volgens Cabaud en Wròblewski.

Tabel 16 - Toxiciteitsproef met door verhitting verkregen ontledingsprodukten van Myc 1080. Gemiddelde hematologische waarden.

Urine-onderzoek

Geen afwijkingen werden gezien in soortelijk gewicht en pH, terwijl het onderzoek op eiwit, ketonen of glucose negatief was. Een enkele maal werd, zowel vòòr als na injectie wat bilirubine gevonden. Eén hond had zowel vòòr als na de injectie soms enig bloed in de urine.

Macroscopische en microscopische bevindingen

Dr. Schornagel vatte zijn bevindingen samen als volgt:

"Ik vond bij deze groep beagles geen duidelijke veranderingen, met name ook niet aan de lever. Wel was de lever arm aan glycogeen, maar dat kan het gevolg zijn van het tijdstip van afmaken."

Conclusie

Met uitzondering van geringe afwijkingen van voorbijgaande aard in enkele hematologische parameters werden geen toxische effecten waargenomen, die het klinisch toepassen van Myc 1080 in de weg zouden staan, te minder, wanneer men bedenkt, dat het onderzoek was verricht met volledig - en dus niet meer actief - ontleed produkt, afgeleid van 5 mg/kg, d.i. ongeveer 10 x de therapeutische dosis.

9. Slotconclusie

De toxiciteitsproeven met honden en met ratten hebben geen afwijkingen opgeleverd, die als een toxische bijwerking van Myc 1080 of van zijn eventuele ontledingsprodukten kunnen worden aangemerkt. De in de hondproef (3.) gevonden siderose kon bij nader onderzoek op geen enkele wijze worden bevestigd, terwijl de groeiremming van ratten (6.)

kon worden verklaard uit verminderde voedselopname, die waarschijnlijk samenhang met geremde darmassage en/of de invloed van het gebruikte algemeen anestheticum. De stof kon na deze bevindingen worden vrijgegeven voor voorzichtige klinische evaluatie.

HOOFDSTUK X

LOT IN HET ORGANISME

1. Inleiding

Om iets te weten te komen over opnemings, verdeling en eliminatie van een stof biedt het vaak voordelen haar radioactief te merken en met daartoe geschikte technieken te vervolgen. Dit geldt in het bijzonder wanneer de stof niet of weinig wordt omgezet of afgebroken. Gebeurt dit wel, dan is het mogelijk, dat de radioactiviteitsverdeling als functie van de tijd iets zegt over één of enkele afbraakprodukten en ons in het onzekere laat over de stof zelf en over andere misschien belangrijker metabolieten.

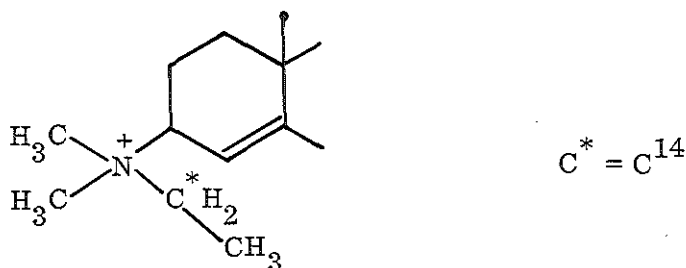
Bij de keuze van de plaats in de molecule die gemerkt moet worden en de keuze van de isotoop, stelt men zich daarom de volgende vragen:

1. welk atoom zal zeer waarschijnlijk niet door metabole activiteiten uit de molecule worden verwijderd?
2. welke isotoop zou men daar willen invoeren: H^3 , C^{14} o.i.d.?
3. wat is chemisch mogelijk?

Het antwoord op de eerste van de drie genoemde vragen is meestal het moeilijkst voorspelbaar en als het al vrij zeker voorspelbaar is, zijn de veelal chemische moeilijkheden onoverkomelijk. Het is bijvoorbeeld vrij zeker, dat een C^{14} uit de A-, B- of C-ring van een steroid niet zal verdwijnen, maar labeling op die plaatsen is chemisch zo moeilijk, dat men de voorkeur zal geven aan een eenvoudiger mogelijkheid.

Overwegende, dat het kwaternaire Myc 1080 waarschijnlijk grotendeels extracellulair zal blijven en de kwaternaire groep in dat geval een kleine kans loopt omgezet te worden, terwijl het bovendien eenvoudig is een C^{14} -gemerkte ethylgroep in te voeren, werd besloten dit laatste te wagen.

Δ -Conessine werd gekoppeld met ethyljodide- C^{14} tot Myc 1080, waarvan de kwaternaire groep er als volgt uitziet:



De specifieke radioactiviteit van de stof bedroeg 3,2 mC/mmol.

Een deel van de hiermee verrichte onderzoekingen is gepubliceerd door Hespe en Wieriks (1).

(1) Hespe, W. & Wieriks, J., *Biochem. Pharmacol.*, 20 (1971), 1213.

2. Proeven bij ratten

2.1. Verloop van de bloedspiegel in relatie tot de eindplaatremmende activiteit

Proefopzet

De stof werd, opgelost in fysiologisch zout, toegediend in de V. jugularis van een mannelijke rat, geanestheeserd met phenobarbital (150 mg/kg i.p.). Gelijktijdig werd de N. ischiadicus geprikkeld met supramaximale rechthoekige prikkels van 1 msec, 5 maal per minuut; de contracties van de M. gastrocnemius werden geregistreerd. De rat werd beademd via een trachea-canule. Het verloop van de radioactiviteit in het bloed werd geregistreerd door bloed van een shunt van de A. carotis te leiden door een speciaal geconstrueerde telapparatuur. Hiervoor werden de dieren gehepariniseerd (500 I. U./rat). Het bloed stroomt in deze opstelling door een circuit van plastic scintillatorslang in een lichtdichte metalen buis, aangebracht tussen twee fotomultiplicators, die verbonden zijn met een hoogspanningstelsnelheidsmeter. Op een Kipp-recorder werden onder elkaar de telsnelheid en de contracties van de M. gastrocnemius geschreven.

Resultaten

Fig. 33 geeft een beeld van de bevindingen. Men ziet een snelle stijging tot een maximum, waarna een aanvankelijk snelle daling optreedt, gevolgd door een langzame.

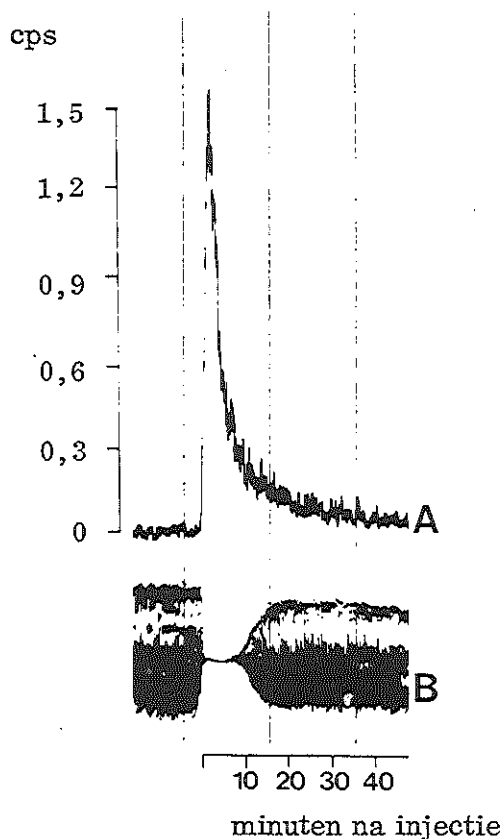


Fig. 33 - Radioactiviteitsverloop in bloed van een rat na i. v. injectie van 5 mg/kg Myc 1080-C¹⁴ (A) en gelijktijdig geschreven contracties van de M. gastrocnemius (B).

Door in een aantal experimenten de gevoeligheid van de meting te vergroten, werd nagegaan bij welke radioactiviteit in het bloed de uitgedoofde spiercontractie weer begon terug te keren.

De resultaten zijn vermeld in tabel 17.

<u>nummer experiment</u>	<u>dosis (mg/kg)</u>	<u>verlammingsduur tot beginnend herstel (min)</u>	<u>bloedspiegel in cps bij beginnend herstel van de contracties</u>
69019	5	7	1,9
69020	10	26	2,1
69023	10	70	2,9
69027	10	28	2,1
69051	10	34	1,8
69059	4	19	1,9
69081	6	14	3,1
69082	8	24	2,4

Tabel 17 - Verklaring, zie tekst.

Uit de tabel blijkt, dat herstel van de contracties bij redelijk overeenstemmende bloedspiegels wordt bereikt, nl. bij ongeveer 2,25 cps.

Tekent men de verlammingsduur tot beginnend herstel als functie van de dosis op lineaire schaal, daarbij de waarden van de ratten 69023 en 69059 buiten beschouwing latend wegens de slechte conditie waarin zij gedurende de hele proef verkeerden, dan snijdt de best passende rechte de dosis-as in het punt 2,89 (= RD_{100} !). Deze waarde ligt vlak bij die van de $RD_{90} = 2,8$ bepaald uit vier farmacologische proeven bij de rat. Dit bevestigt de betrouwbaarheid van de waarnemingen.

2.2. Onderzoek naar de wijze van eliminatie van Myc 1080-C¹⁴

Er zijn drie mogelijkheden van eliminatie uit het bloed, die in eerste instantie moeten worden overwogen, wanneer men voorlopig veronderstelt, dat de stof niet wordt afgebroken. Deze zijn: eliminatie, via de nier, met de gal naar de faeces en opname in bepaalde organen of weefsels.

Over deze mogelijkheden geven, naast de nog te beschrijven macroautoradiografische onderzoeken, de volgende proeven, steeds verricht bij drie dieren, enig inzicht.

2.2.1. Proeven bij ratten met afgebonden galgangen

Proefopzet

Deze is identiek aan de in 2.1. beschreven methode. Alleen het proefdier verschilt door de onmogelijkheid van galuitscheiding, doordat de galwegen 24 uur tevoren waren onderbonden. De dosis bedroeg 10 mg/kg intraveneus.

Ratten zijn bij uitstek galsecernerende dieren en elimineren veel via galexcretie. Het lag dus voor de hand te veronderstellen, dat onderbinding van de galafvoerwegen grote gevolgen zou hebben voor de verdwijnsnelheid uit het bloed, wanneer er een eliminatie via de gal van enige betekenis plaats vindt, tenzij er een intensieve enterohepatische kringloop bestaat.

Resultaten

De verlamingsduur is iets verlengd en de verdwijning van radioactiviteit uit het bloed iets trager (fig. 34).

De beoordeling is echter moeilijk, omdat de dieren in een slechte algemene conditie kwamen te verkeren.

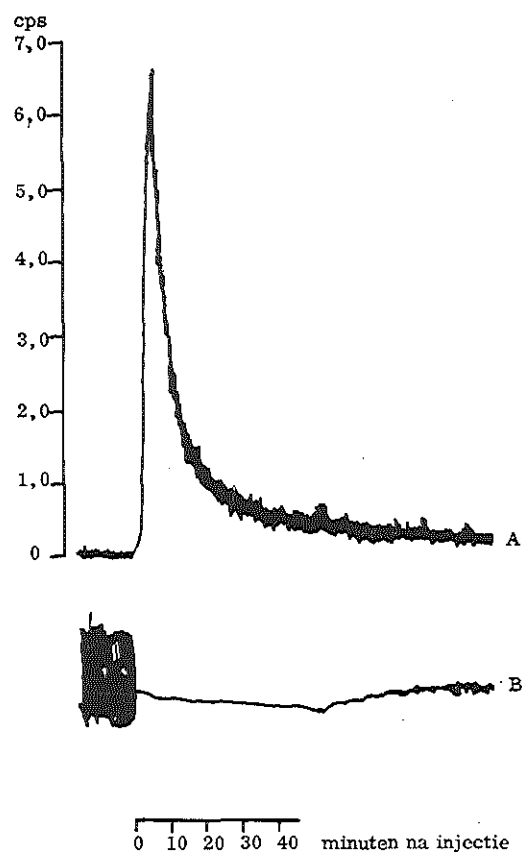


Fig. 34 - Radioactiviteitsverloop in bloed van een rat met afgebonden galgang na i.v. injectie van 10 mg/kg Myc 1080- C^{14} (A) en gelijktijdig geschreven contracties van de *M.gastrocnemius* (B).

Conclusie

Als de stof door de gal wordt uitgescheiden, is de betekenis hiervan voor de snelle daling van de bloedspiegel gering; wèl kan de langzame tweede fase er geheel of gedeeltelijk door worden verklaard.

2.2.2. Proeven bij ratten met gecanuleerde galwegen

Proefopzet

Deze verschilt van die van de vorige proef (2.2.1.) doordat de galwegen nu niet zijn afgebonden, maar gecanuleerd. De gal werd verzameld en de uitgescheiden radioactiviteit gemeten als functie van de tijd. De dosis bedroeg weer 10 mg/kg intraveneus.

Resultaten

Fig. 35 geeft een indruk van het bloedspiegelverloop en de gesommeerde excretie in de gal, uitgedrukt in % van de toegediende dosis.

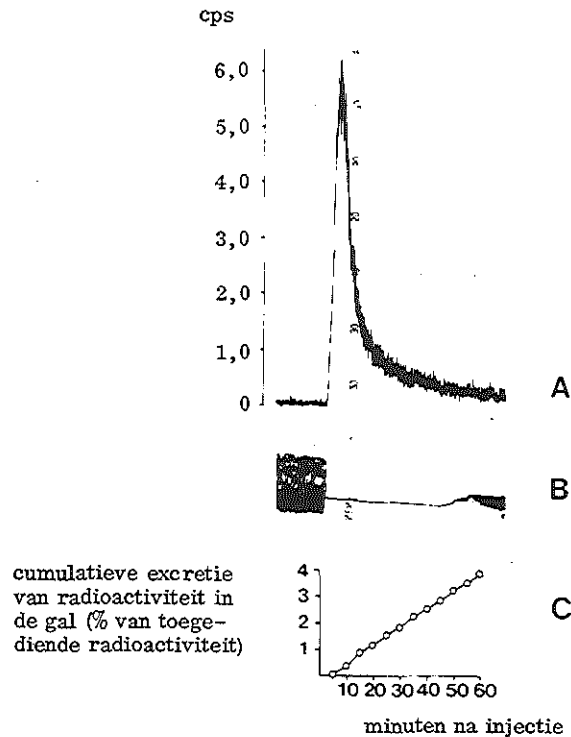


Fig. 35 - Radioactiviteitsverloop in bloed van een rat waarvan de galgang is gecanuleerd na i.v. injectie van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴ (A), gelijktijdig geschreven contracties van de M. gastrocnemius (B) en cumulatieve excretie van radioactiviteit in de gal (C).

Conclusie

De eliminatie via de gal is niet onaanzienlijk, maar onvoldoende om de snelle daling van de radioactiviteit in het bloed te verklaren: gedurende de periode van spierverlamming wordt slechts 5% van de toegediende dosis in de gal uitgescheiden.

2.2.3. Proeven bij ratten met afgebonden nierarteriën

Proefopzet

Deze is gelijk aan de vorige. Nu echter zijn de nierarteriën afgebonden in plaats van de galwegen.

Resultaten

Deze zijn in essentie gelijk aan de resultaten, verkregen bij ratten met cholestasis.

Conclusie

Als de stof door de nier wordt uitgescheiden, is dit kwantitatief te gering om de snelle daling van de radioactiviteit in het bloed te verklaren.

2.2.4. Proeven bij ratten met blaascanule

Proefopzet

Bij 2 vrouwtjesratten werd een blaasfistel gemaakt en de opgevangen urine onderzocht op radioactiviteit na toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴ i.v.

Resultaten

Fig. 36 geeft de cumulatieve uitscheiding van radioactief materiaal als functie van de tijd.

cumulatieve ex-
cretie van radio-
activiteit in de
urine (% van de
toegediende
dosis)

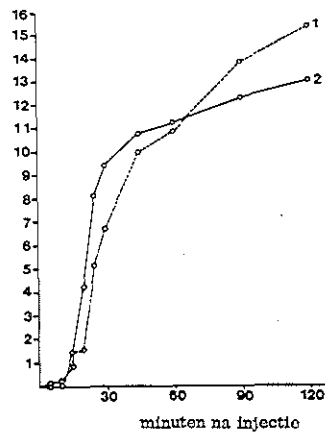


Fig. 36 - Cumulatieve excretie van radioactiviteit in de urino van twee ratten met gecanuleerde urinoblaas na i.v. injectie van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

Conclusie

De eliminatie van Myc 1080 via de nier bedraagt gedurende het eerste uur 11% van de toegediende dosis. Dit is meer dan die via de gal, welke gedurende dezelfde periode 4% bedraagt. Toch is de snelle initiële daling van radioactiviteit in het bloed hiermee niet verklaard en evenmin met de som van de eliminatie via gal en urine.

2.2.5. Bepaling van binding aan serum-eiwitten

De snelle "clearance" van Myc 1080 uit het bloed maakt het niet waarschijnlijk, dat de stof sterk aan bloedbestanddelen wordt gebonden. De volgende proef bevestigt deze veronderstelling.

Methode

In een dialysezakje (Visking 27/32) werden 1 ml ratteserum en 20 ml van een met serum isotone bufferoplossing van een bepaalde pH samengebracht. In het dialysebad bevond zich ongeveer 130 µg Myc 1080-C¹⁴, opgelost in 21 ml van dezelfde buffer. Het dialysezakje werd gedurende 24 uur in de oplossing gehangen en de verdeling van de radioactiviteit over de beide compartimenten nagegaan. Hieruit werd het bindingspercentage berekend volgens de formule:

$$\text{bindingspercentage} = \frac{\text{dpm/ml dialysezakje} - \text{dpm/ml dialysebad}}{\text{dpm/ml dialysezakje}} \times 100 \%$$

waarin dpm = "desintegrations per minute" = gemeten radioactiviteit, gecorrigeerd tot werkelijke activiteit.

Resultaten

Tabel 18 geeft een overzicht van de resultaten. Elk getal is het gemiddelde uit twee proeven.

<u>pH</u>	<u>buffer</u>	<u>bindingspercentage</u>
3	citraatbuffer	0,0
4	"	0,0
5	"	0,0
6	"	1,0
7	"	0,5
8	"	1,9
8	boraatbuffer	6,8
9	"	6,2
10	"	11,7
11	"	16,7
12	"	35,1
13	"	50,2

Tabel 18 - Binding van radioactiviteit aan serum-eiwitten bij verschillende pH's.

Conclusie

In het fysiologische pH-gebied is de binding van Myc 1080 aan serum-eiwitten zeer gering.

2.2.6.

Uit de voorgaande proeven volgt per exclusionem, dat bij de snelle eliminatiefase van Myc 1080 uit het bloed excretie met urine of gal vrijwel geen rol speelt, zodat moet worden aangenomen, dat de stof snel wordt opgenomen in bepaalde organen of weefsels. Gelet op de uiterst geringe binding aan serum-eiwitten bij fysiologische pH, lijkt binding aan eiwitten hierbij niet waarschijnlijk. Gezien het feit dat de binding aan serum-eiwitten sterk toeneemt bij stijgende pH, ligt de veronderstelling voor de hand, dat Myc 1080, een basische stof, zich ionogeen zal binden aan stoffen die bij fysiologische pH negatief geladen zijn. Hiervoor komen uiteraard in de eerste plaats in aanmerking zure mucopolysacchariden. De onder 2.4. beschreven autoradiografische onderzoeken ondersteunen deze veronderstelling.

Om de invloed van zure mucopolysacchariden op de activiteit van 1 mg/kg Myc 1080 directer te benaderen, bepaalden wij de T₅₀-waarden bij 2 katten vóór en na toediening van heparine 4000 resp. 5000 I. U./kg (eveneens een mucopolysaccharide). Er werd geen verkorting van de T₅₀-waarde waargenomen als gevolg van binding van Myc 1080 aan het toegediende heparine.

Bij nader inzien konden deze proeven niet veel opleveren, omdat de hoeveelheid heparine, die kon worden gegeven, zeer klein was ten opzichte van de hoeveelheid mucopolysacchariden in het gehele lichaam. Daarom werd de proef herhaald in vitro met het Bülbring-preparaat (Hoofdstuk XI).

Hier werden enkele waarnemingen gedaan die vermeldenswaard zijn.

Eerst werd (fig. 37 A) heparine alleen gegeven. Het bleek, dat na een korte latente tijd de contracties afnamen. Een mogelijke verklaring is, dat het heparine, nadat het met enige moeite (latente tijd) tot het eindplaatgebied is doorgedrongen, het acetylcholine gaat wegvangen, dus in competitie treedt met de acetylcholine-receptoren.

Vervolgens werd (fig. 37 B) aan een vers preparaat Myc 1080 gegeven in een submaximale dosering. Tijdens de fase van gereduceerde contractiehoogte werd heparine toegevoegd in doseringen van 1250, 2500 en 5000 I. U. Het verschil in effect van deze doseringen was niet indrukwekkend, maar er was wel iets van een dosis-werkingsrelatie aanwezig.

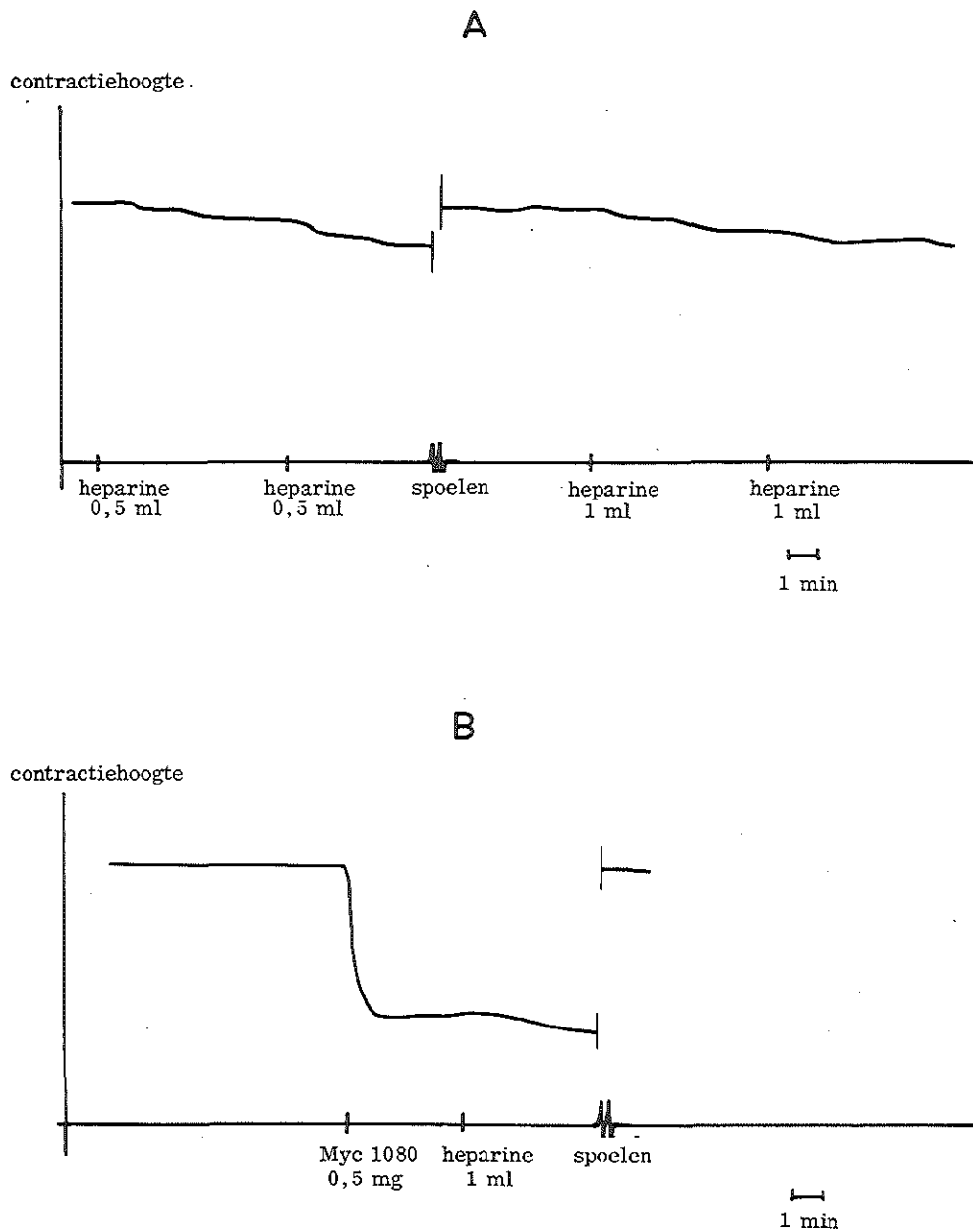


Fig. 37 - Invloed van heparine op de contracties van het rattediafragma in vitro zonder (A) en bij aanwezigheid van Myc 1080 in het orgaanbad (B).

Het effect van de interactie bestond uit een korte episode van geringe afneming van de paralyse, gevolgd door een toeneming van de paralyse tot boven het niveau vòòr de heparine-toediening.

De initiële afneming duurde ongeveer even lang als de latente tijd van heparine alleen. Men zou kunnen speculeren, dat heparine acuut Myc 1080 uit het orgaanbad bindt, waardoor de concentratie van Myc 1080 aan de receptor daalt, met als gevolg afneming van de paralyse. Nadat het heparine tot de eindplaat is doorgedrongen, ontstaat echter een competitie met de receptor voor acetylcholine, waardoor de verlamming toeneemt. Deze resultaten vragen om een directe bepaling van de affiniteit van acetylcholine tot heparine. Maar deze zijweg hebben wij niet betreden.

2.3. Kwantificering van de eliminatie

Proefopzet

Myc 1080-C¹⁴, in fysiologisch zout opgelost, werd i.v. toegediend aan mannetjesratten van 150-180 gram in een dosis van 5 of 10 mg/kg. Tijdens de periode van ademstilstand werd kunstmatig beademd. Bij een deel van de ratten werd de galgang afgebonden en doorgeknipt. Om uit te maken of een enterohepatische kringloop van enige betekenis te verwachten is, werd aan twee ratten een dosis van 10 mg/kg oraal toegediend en de excretie via urine, faeces en ademlucht gedurende 72 uur gemeten.

Nadat de dieren weer zelfstandig konden ademen, werden zij in metabolismekooien gezet, waarin urine, faeces en uitademings-CO₂ (door binding aan ethanolamine-bevattend scintillatiemengsel (1)) gescheiden verzameld kunnen worden. Hiervan werd de radioactiviteit gemeten.

De urine werd geëxtraheerd met butanol of met dichloorethaan als de butanolextracten sterk verontreinigd bleken te zijn. De extracten werden drooggedampt en het residu opgelost in methanol door een dunnelaagchromatografische analyse.

De gebruikte loopvloeistof was benzeen/pyridine/ijsazijn (65/20/15).

De radioactiviteit van de verkregen chromatogrammen werd gemeten met een Berthold-Dünnschicht-scanner.

Resultaten

Deze staan vermeld in tabel 19.

uitscheiding in % van de toegediende radioactiviteitsdosis

<u>experiment nummer</u>	<u>dosis (mg/kg i.v.)</u>	<u>cholestasis</u>	<u>periode (uren)</u>	<u>urine</u>	<u>faeces</u>	<u>C¹⁴O₂ (0-7u)</u>	<u>Totaal</u>
69001	5	-	0-144	16,0	61,5	0,0	77,5
69002	5	-	0-144	17,1	61,0	0,0	78,1
69023	10	-	0-240	13,6	63,1	-	76,7
69024	10	-	0-240	9,0	71,1	-	81,0
69041	10	-	0-168	14,3	41,2	-	55,5
69042	10	-	0-168	16,0	51,7	-	67,7
69021	10	+	0-240	23,0	14,9	-	37,9
69022	10	+	0-240	26,6	3,6	-	30,2
69040 *)	10	+	0-144	59,6	7,9	-	67,5
68256	10 <u>oraal</u>	-	0-72	0,7	78,7	0,0	79,4
68257	10 <u>oraal</u>	-	0-72	1,1	87,0	0,0	88,1

*) bij deze rat werd zorgvuldig alle urine verzameld; die tijdens het kunstmatig beademen reeds werd geloosd.

Tabel 19 - verklaring zie tekst. Tijdstip 0 = moment van plaatsen in stofwisselingskooi.

(1) Jeffay, H. & Alvarez, J., Anal. Chem., 33 (1961), 612.

De cumulatieve uitscheiding in urine en faeces in % van de toegediende radioactieve dosis, gemeten gedurende 240 uur bij de 10 mg/kg ratten met en zonder cholestasis, is grafisch weergegeven in de figuren 38 en 39.

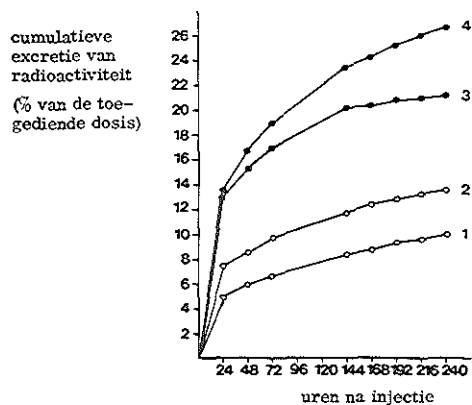


Fig. 38 - Cumulatieve excretie van radioactiviteit in de urine van normale ratten (—○—) en ratten met cholestasis (—●—) na i.v. toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

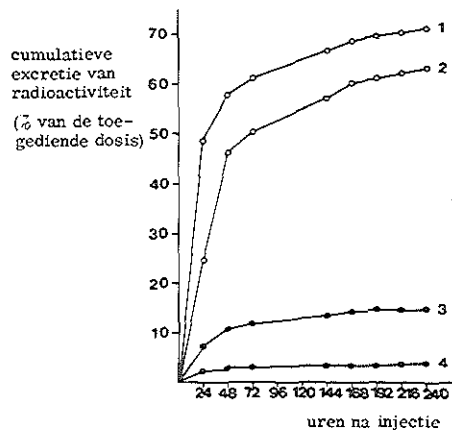


Fig. 39 - Cumulatieve excretie van radioactiviteit in de faeces van normale ratten (—○—) en ratten met cholestasis (—●—) na i.v. toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

Chromatografisch onderzoek van de urine gaf geen duidelijke aanwijzing voor biotransformatie van Myc 1080.

Discussie

1. Uit de orale proef volgt, dat de stof slecht wordt geresorbeerd uit het maag-darmkanaal. Van een enterohepatische kringloop kan dus nauwelijks sprake zijn.
2. Bij i.v. ingespoten ratten volgt uit de hoge faeceswaarden bij normale ratten en de lage faeceswaarden bij ratten met cholestasis, dat er op de lange duur een omvangrijke eliminatie via de gal plaats vindt. De waarden verschillen ongeveer 55% der toegediende radioactiviteitsdosis. Dit wijst erop, dat bij normale ratten ongeveer 55% van de i.v. toegediende dosis in 240 uur met de gal wordt geëlimineerd. Meyer en Weitering (1) hebben het gedrag van verschillende curare-achtige verbindingen in de geperfuseerde lever bestudeerd en aanmerkelijke verschillen gevonden in de snelheid van eliminatie van de diverse onderzochte stoffen. Zij menen op grond van een parallellisme tussen de mate van oplosbaarheid in octanol-1 en de snelheid van eliminatie via de gal, dat de meer lipofiele stoffen sneller worden geëlimineerd dan de meer hydrofiele. Het voorkomen van radioactiviteit in de faeces bij ratten met cholestasis wijst op een diffusie naar het maag-darmkanaal. Deze bedraagt gemiddeld bijna 10% der toegediende radioactiviteitsdosis.

(1) Meyer, D.K.F. & Weitering, J.G., Eur.J.Pharmacol., 10 (1970), 283.

3. De excretie via de urine is aanmerkelijk. Bedenkt men, dat van rat 69040 met cholestasis, waarvan de urine al vóór plaatsing in de kooi was opgevangen en de huid met water goed was afgespoeld, op het tijdstip 144 uur de concentratie in de urine veel hoger was (15%) dan die van de andere ratten met cholestasis, waarbij de urine pas werd opgevangen vanaf het moment van plaatsing in de kooi, dan mag men onder voorbehoud van de kleine proefgroep (1 dier) verwachten, dat bij alle andere dieren de gevonden waarden in de urine te laag waren (ca. 15%?).
4. De stof wordt vrijwel niet omgezet blijkens de afwezigheid van $C^{14}O_2$ in de uitademingslucht en het ontbreken van metabolieten in de urine. N-dealkyleringsprocessen plegen zich in de levermicrosomen af te spelen. Door het sterk hydrofiele karakter van de stof is het onwaarschijnlijk, dat de stof tot deze microsomen doordringt.
5. Bij semilogaritmisch uitzetten van de radioactiviteit in urine en faeces vertoont de eliminatie een bifasisch patroon met voor de langzame fase in de urine een gemiddelde $T_{1/2} = 108$ uur en in de faeces een gemiddelde $T_{1/2} = 71$ uur (fig. 40). Deze waarden verschillen, hetgeen erop wijst, dat er in het organisme geen evenwichts-situatie bestaat. Dit zou kunnen worden verklaard doordat de eliminatie in urine en faeces geschiedt uit gescheiden depots.

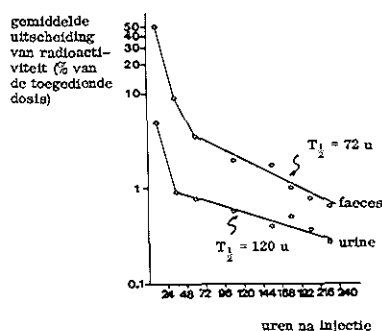


Fig. 40 - Excretie van radioactiviteit in urine en faeces van ratten na i.v. toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

Conclusie

Over 240 uur gemeten, blijkt dat na i.v. toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴ aan de rat ongeveer het volgende eliminatiepatroon ontstaat:

uitademingslucht	0 %
urine	25 %
via gal in faeces	55 %
diffusie naar maag-darmkanaal	10 %
Totaal	90 %

De stof wordt waarschijnlijk geheel onveranderd geëlimineerd, al kan een geringe mate van afbraak niet geheel worden uitgesloten.

2.4. Verdeling van Myc 1080-C¹⁴ in het organisme

Uit de beschreven eliminatieproeven is gebleken, dat de stof vrijwel of in het geheel niet wordt afgebroken. Macroautoradiografisch onderzoek kan ons dus vrij zeker iets leren over de distributie van de intacte stof.

Proefopzet

Myc 1080-C¹⁴, opgelost in fysiologisch zout, werd intraveneus toegediend in een dosering van 10 mg/kg aan mannetjesratten van 150-175 gram. Tijdens de ademverlamming werd kunstmatig beademd op de wijze, zoals beschreven in Hoofdstuk IX punt 6.

Op de tijdstippen 2, 4, 8, 15 en 30 minuten en 1, 4, 24, 48 en 120 uur na toedienen werd telkens een rat gedood, door hem in een lichte ethernarcose onder te dompelen in een koolzuur-aceton-mengsel. Na geheel te zijn bevroren werden de ratten overgebracht naar de vrieskamer, waar bij -15°C de autoradiografische werkzaamheden werden verricht.

De autoradiografie

De gebruikte techniek was vrijwel identiek aan de oorspronkelijke, door Ullberg beschreven methode (1).

In een vrieskamer werden bij -15°C coupes van het gehele dier gesneden, 30 µ dik, met een speciaal microtoom. Na enkele dagen drogen in de vriesruimte werden de secties in dezelfde ruimte in contact gebracht met fotografische platen.

Platen met coupes werden in een lichtdichte verpakking overgebracht naar een diepvriesruimte van -20°C. Om het verloop van het contrast van het beeld in de tijd te kunnen volgen werd een aantal controleplaten naast de hoofdserie afzonderlijk ingezet voor tussentijdse ontwikkeling.

Van de verkregen autoradiogrammen werden afdrucken gemaakt, die dus de negatieven ervan zijn. Hierin stelt wit een plaats van radioactiviteit voor.

Histologie

Ter vergemakkelijking van de interpretatie werd een deel van de coupes na afloop van de belichtingstijd gekleurd met hematoxyline-eosine of alciaanblauw, een kleurstof, die specifiek zure mucopolysacchariden kleurt.

Van een aantal hierna ter illustratie gegeven foto's wordt op dezelfde schaal zowel de zwart-wit afbeelding van de gekleurde coupe als het bijbehorende autoradiogram gegeven.

Kwantificering van de radioactiviteit

Met behulp van een kleine kurkboor werden ponsjes genomen uit het bloed van een hartkamer en uit de lever. Deze ponsjes, die dus steeds van gelijke grootte waren, werden in een flesje gebracht, waarna een cocktail voor vloeistofscintillatiemetingen volgens Bray (2) werd toegevoegd. Daarna werd de radioactiviteit gemeten met een vloeistofscintillatiespectrometer. Deze methode van meting van radioactiviteit in een heterogeen systeem is door Wang en Jones (3) beschreven voor stukjes, met radioactieve stof geïmpregneerd, filtreerpapier.

Toelichting bij de autoradiogrammen

In de hierna volgende autoradiogrammen zijn de diverse organen en weefsels als volgt aangegeven:

1. oog	9. atrium	17. milt	24. tussenwer-	30. huid
2. cerebrum	10. ventrikelwand	18. testis	velschijf	31. ovarium
3. cerebellum	11. bloed	19. rib	25. ileum	32. tuba
4. meningen	12. long	20. plexus cho-	26. colon	33. placenta
5. tong	13. lever	rioidalis	27. haarfollikels	34. foetus
6. speekselklier	14. maag	21. hypofyse	28. epifysair-	35. rectum
7. bindweefsel	15. nier	22. ruggemerg	schijf	36. urineblaas
8. thymus	16. coecum	23. wervel	29. beenmerg	37. uteruswand

(1) Ullberg, S., Acta Radiol., suppl. 118 (1954).

(2) Bray, G.A., Anal. Biochem., 1 (1960), 279.

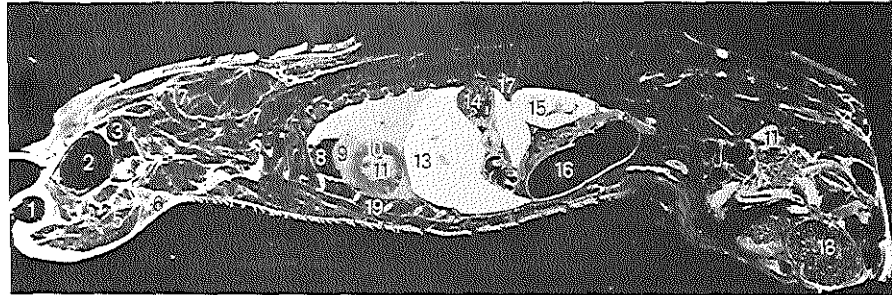
(3) Wang, C.H. & Jones, D.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1 (1959), 203.

Resultaten

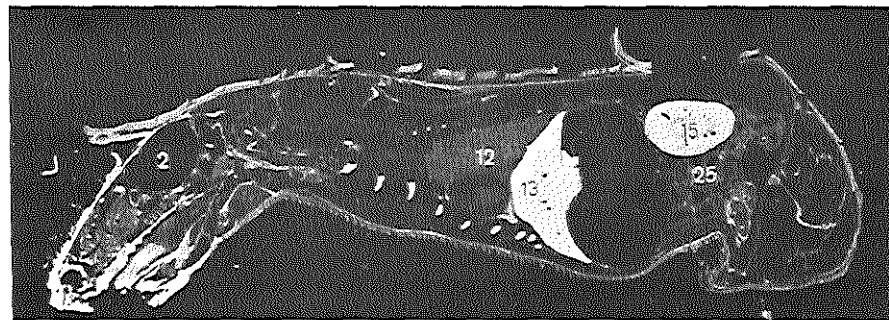
1. Fig. 41 geeft de radioactiviteitsverdeling weer op de tijdstippen 4, 8, 60 minuten en 24 en 120 uur na de i.v. injectie van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

Fig. 41

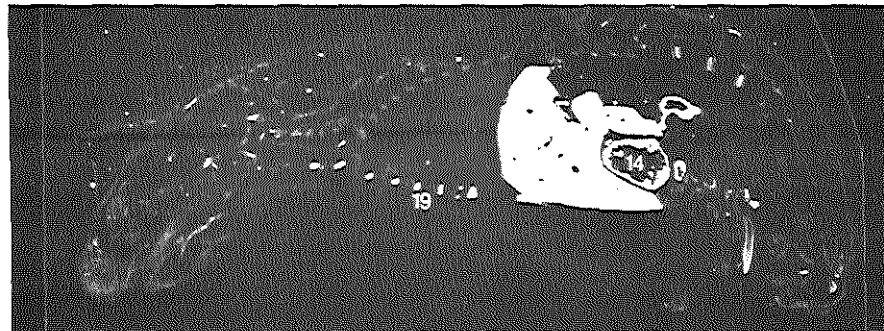
a - 4 minuten
na injectie



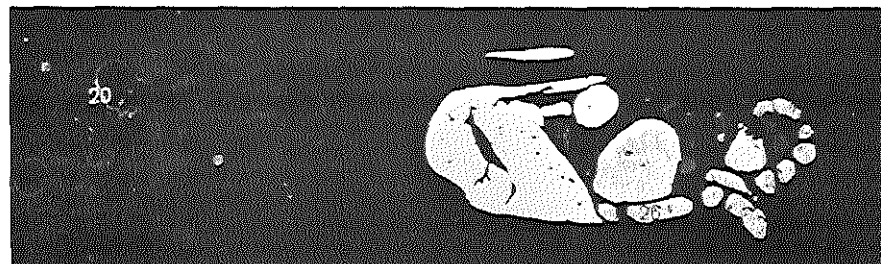
b - 8 minuten
na injectie



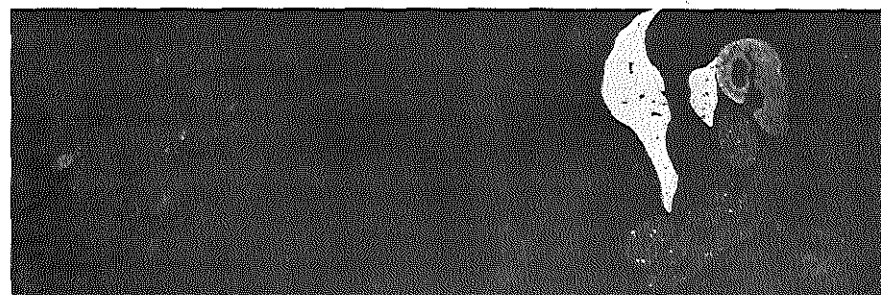
c - 1 uur na
injectie



d - 24 uur na
injectie



e - 120 uur na
injectie



Men ziet hieruit duidelijk, dat de stof na een kortdurende verdeling over allerlei structuren in het lichaam snel wordt geredistribueerd naar voornamelijk de lever en in mindere mate de nier (zie ook detailvergroting fig. 42).

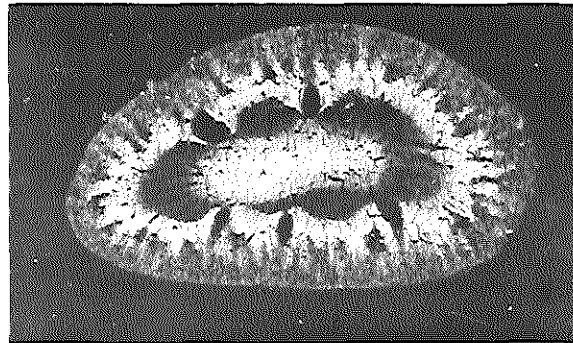


Fig. 42 - Autoradiogram van een niercoupe (detailvergroting).
8 minuten na injectie

Pas na 30 minuten (niet afgebeeld) verschijnt de stof in de darm. Het meest aannemelijk is, dat dit voornamelijk gebeurt door een excretie via de gal, zoals hierboven reeds werd aangetoond. Reeds na 15 minuten is vrijwel alle radioactiviteit in de lever en in mindere mate in de nier gelokaliseerd.

De korte werkingsduur van Myc 1080 is dus waarschijnlijk te verklaren uit deze snelle redistributie.

In de interessante detailvergrotingen (fig. 43, 44a, 44b, 45a, 45b) ziet men o. a. ophoping van radioactiviteit in bind- en steunweefsel en subperiostale structuren van het bot, in de epifysairschijven van de wervels en in de haarfollikels, terwijl geen radioactiviteit wordt gevonden in de hersenen.

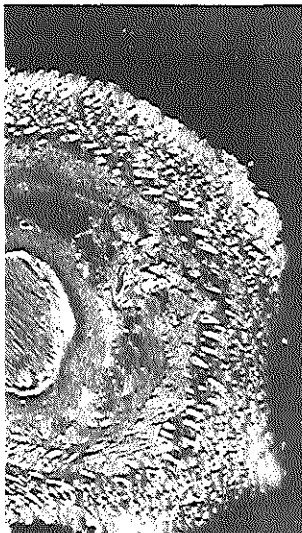


Fig. 43 - Detailvergroting haarfollikels
2 minuten na injectie
(autoradiogram)



a



b

Fig. 44 - (a) detailvergroting 2 minuten na injectie (coupe), (b) autoradiogram van (a)



Fig. 45 a - Detailvergroting 2 minuten na injectie (coupe).

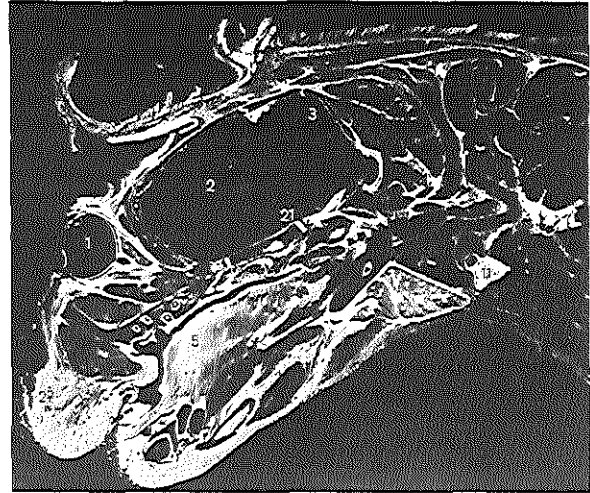


Fig. 45 b - Autoradiogram van fig. 45 a.

2. Het kwantitatieve verloop van de radioactiviteit in bloed en lever, zoals die is gemeten aan de ponsjes, is weergegeven in tabel 20.

<u>tijdstip na injectie</u>	<u>gemiddelde radioactiviteit van 3 identieke steekproeven (cpm/gewichtseenheid)</u>	
	<u>bloed</u>	<u>lever</u>
2 min	32,4	206
4 min	15,3	270
8 min	6,2	272
15 min	7,7	346
30 min	4,5	520
1 uur	4,6	400
4 uur	1,3	475
24 uur	0,83	184
48 uur	0,13	161
120 uur	0,033	60

Tabel 20 - Radioactiviteit in bloed en lever op verschillende tijdstippen na i.v. toediening van 10 mg/kg Myc 1080-C¹⁴ bij ratten.

Vergelijkt men het verloop van radioactiviteit in het bloed, dan blijkt er een treffende overeenstemming te bestaan met het reeds eerder gevonden verloop (fig. 33).

De radioactiviteit in de lever bereikt haar maximum op of omstreeks 30 minuten na toediening om daarna geleidelijk af te nemen. Na 120 uur is nog ongeveer 10% van deze maximumwaarde in de lever aanwezig. Bij benadering is dit ongeveer 10% van de totale hoeveelheid toegediende radioactiviteit.

In het algemeen kan men stellen, dat de stof niet wordt opgenomen in parenchymcellen, met uitzondering van die van de uitscheidingsorganen, lever en nier, wèl echter affiniteit bezit voor bind- en steunweefsel. De stof blijft dus voornamelijk extracellulair, kan dus receptoren bereiken die gelegen zijn aan het oppervlak van cellen, zoals cholinerge receptoren van dwarsgestreepte spieren en van ganglioncellen.

Discussie

De sterke binding door de lever kan met macroautoradiografie niet worden gelokaliseerd. Zeer waarschijnlijk echter wordt de stof intracellulair opgehoopt, omdat de stof sterk met de gal wordt uitgescheiden. Onder normale omstandigheden zijn geen directe verbindingen tussen bloedvaten en galcaniculi aangetoond. De membraan van de levercellen onderscheidt zich van andere celmembranen door de aanwezigheid van grote poriën, waardoorheen ook vet-onoplosbare stoffen kunnen worden opgenomen (1). Door deze poriën zou ook Myc 1080- C^{14} in de levercellen kunnen worden opgenomen en op de een of andere manier daarin worden vastgehouden, totdat excretie met de gal volgt.

De verdeling in de nier is niet egaal (fig. 42). De radioactiviteit is vooral gelokaliseerd in de tubuli, weinig in de cortex, waar zich de glomeruli bevinden.

Waarschijnlijk bevat de nier een depot, waaruit de stof met een halfwaardetijd van 108 uur (langer dan van de gal excretie) wordt geëlimineerd.

De afnemende radioactiviteit in de tijd in de darminhoud en in de lever houden gelijke tred met elkaar, hetgeen overeenstemt met de onder 2.2.2. gevonden uitscheiding van Myc 1080 met de gal.

De verschillen in halfwaardetijd tussen excretie met urine en faeces (resp. 108 en 71 uur) wijzen op het bestaan van twee gescheiden depots, die niet met elkaar in kinetisch evenwicht zijn. Bovendien kunnen nog actieve transportmechanismen, zowel in de nier als in de lever, zoals voor andere kwaternaire stoffen is beschreven (2, 3), een rol spelen bij de ongelijke halfwaardetijden.

Vergelijkt men deze bevindingen met de door Cohen et al. (4) beschreven verdeling van d-tubocurarine- H^3 , gallamine- H^3 en decamethonium- H^3 , dan zijn enkele verschillen onmiskenbaar. Zo hoopt zich al snel na de intraveneuze injectie (5 en 15 minuten) radioactiviteit op, behalve in nieren en lever, ook in hart, milt en speekselklieren (d-tubocurarine), in longen, milt en speekselklieren (gallamine) en in longen en milt (decamethonium).

In dit hoofdstuk is onder 2.2.6. de veronderstelling geopperd, dat Myc 1080 zich ionogeen zal binden aan zure mucopolysacchariden. Omdat het eindplaatgebied en collageen bindweefsel rijk zijn aan deze stoffen, is de bevinding dat radioactiviteit zich ophoopt aan bind- en steunweefsel, een aanwijzing voor de juistheid van deze hypothese. Dat de stof zich ook ophoopt in het eindplaatgebied wordt bewezen onder punt 6.

Lammers (5) toonde aan, dat tijdelijke anoxie van de lever tijdens de herstelfase van een algehele spierparalyse door d-tubocurarine leidt tot recurarisatie. Hij veronderstelt dat de grote hoeveelheid d-tubocurarine, gebonden in de lever door de anoxie, partieel weer wordt vrijgemaakt en in de circulatie komt. Met instemming citeert hij de uitspraak van MacIntosh, dat na elke operatie neostigmine behoort te worden gegeven om ademstilstand door recurarisatie te voorkomen. Een op het oog normaal ademende patient kan immers hypoxemisch worden wanneer de ademspieren nog partieel verlamd zijn. De als gevolg daarvan nog insufficiënte gaswisseling leidt tot hypoxemie met ademstilstand door recurarisatie als gevolg. Een voordeel van Myc 1080 zou kunnen zijn, dat door de grote snelheid van redistributie naar de lever en de nieren de concentratie aan de receptoren in het eindplaatgebied zo snel afneemt, dat insufficiënte ademhaling niet hoeft te worden gevreesd. Dit zou kunnen betekenen, dat klinisch het gebruik van neostigmine zo niet geheel kan worden nagelaten, dan toch zeer sterk kan worden beperkt. Deze veronderstelling blijkt met de klinische ervaring van Admiraal (persoonlijke mededeling) te kloppen.

(1) Schanker, L.S., *Pharmacol.Rev.*, 14 (1962), 501.

(2) Schanker, L.S., *Amer.J.Physiol.*, 204 (1963), 829.

(3) Peters, L., *Pharmacol.Rev.*, 12 (1960), 1.

(4) Cohen, E.N., Hood, N. & Golling, R., *Anaesthesiol.*, 29 (1968), 987.

(5) Lammers, W., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 99 (1954), 328.

2.5. Placenta-passage

Uit farmacologische onderzoeken (Hoofdstuk VIII, punt 6) kon bij verschillende species geen placenta-passage worden aangetoond.

Besloten werd na te gaan, of deze bevinding met Myc 1080-C¹⁴ kon worden bevestigd. Er was reeds gevonden, dat de stof de "blood-brain barrier" niet passeert. Men neemt aan, dat de placenta-barrière kwalitatief en kwantitatief hiermee grote overeenkomst vertoont. Als dit ook geldt voor Myc 1080, zal dus geen of vrijwel geen radioactiviteit in de foetus worden gevonden.

Proefopzet

De proef werd gedaan bij zwangere ratten van 150 gram. De stof werd gegeven in een dosis van 10 mg/kg i.v. op de dagen 7, 13 en 20 van de zwangerschap. Op dag 7 is de inbedding van de vrucht juist voltooid, op dag 13 zijn de meeste organen aangelegd en is de placenta rijper, en dag 20 is de dag vòòr de partus.

Deze laatste dag is van het meeste gewicht voor de vraag of de stof tijdens een sectio caesarea gebruikt, veilig is voor het kind.

De ratten werden gedood op de tijdstippen 15 minuten en 4 uur na intraveneuze toediening van Myc 1080-C¹⁴ en autoradiografisch onderzocht. De procedure was dezelfde als beschreven onder 2.4.

Resultaten

1. Het moederdier vertoont dezelfde verdeling als bij de mannelijke rat gevonden werd. Van één der ratten werden femur en tibia getroffen (fig. 46).

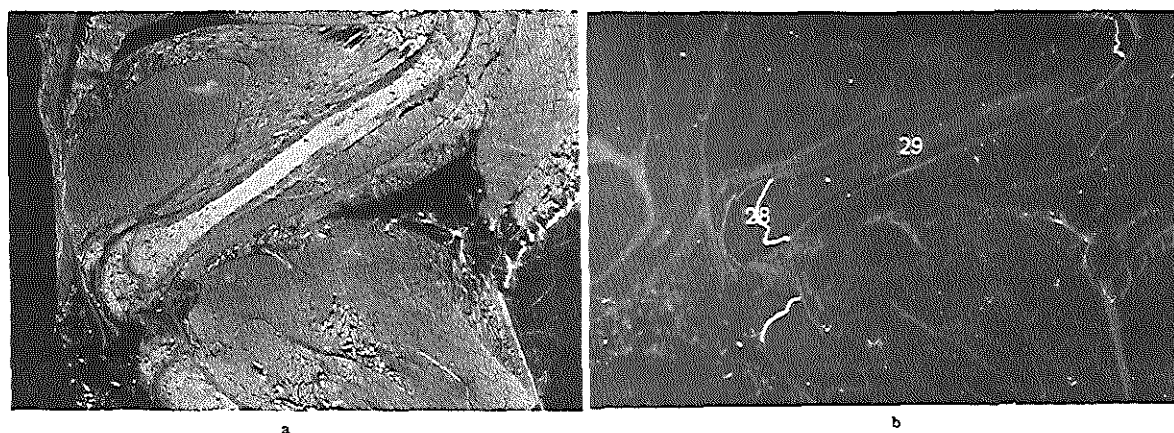


Fig. 46 - (a) Detailvergroting. 20 Dagen zwanger, 15 minuten na injectie (coupe), (b) autoradiogram van (a)

Duidelijk blijkt de sterke ophoping van radioactiviteit in de epifysaire schijven. Ook in de ovaria, rond de follikels, wordt radioactiviteit gevonden (fig. 47).

2. Embryo's op dag 7

Afbeelding 48 toont twee embryo's in utero en doorsneden door de tuba (of uterus hoorn). De eerste bevatten wel radioactiviteit, mogelijk voornamelijk in de primitieve placenta, de laatste bevatten meer van de stof. De belichtingstijd is echter lang (84 dagen). Er moet dus geen overdreven betekenis worden gehecht aan de hoeveelheden.

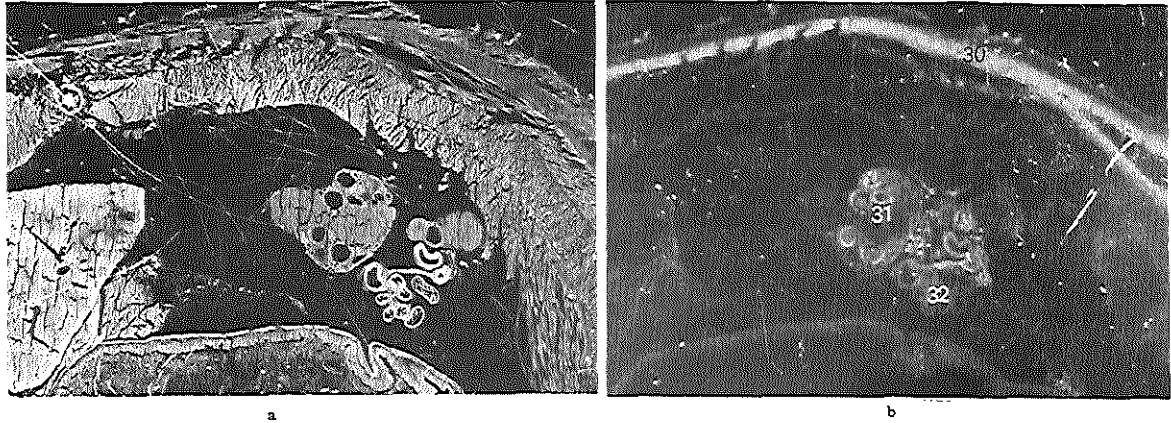


Fig. 47 - 7 dagen zwanger, 15 minuten na injectie, coupe (a) en autoradiogram (b).

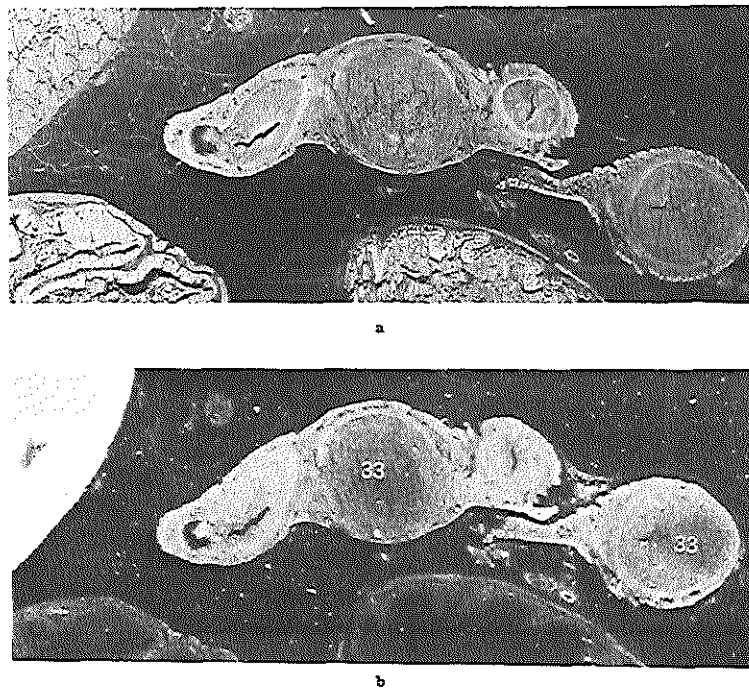


Fig. 48 - Detailvergroting. 7 dagen zwanger, 15 minuten na injectie, coupe (a) en autoradiogram (b).

3. Embryo's op dag 13

De placenta en het foetus zijn in dit stadium veel verder ontwikkeld. De placenta blijkt nu een effectieve barrière te zijn voor Myc 1080-C¹⁴ (fig. 49). Ook na zeer langdurige belichting (84 dagen) ziet men geen tekening in de vruchtzak (fig. 50).



Fig. 49 - Detailvergroting. 13 dagen zwanger, 15 minuten na injectie, coupe (a) en autoradiogram (b).

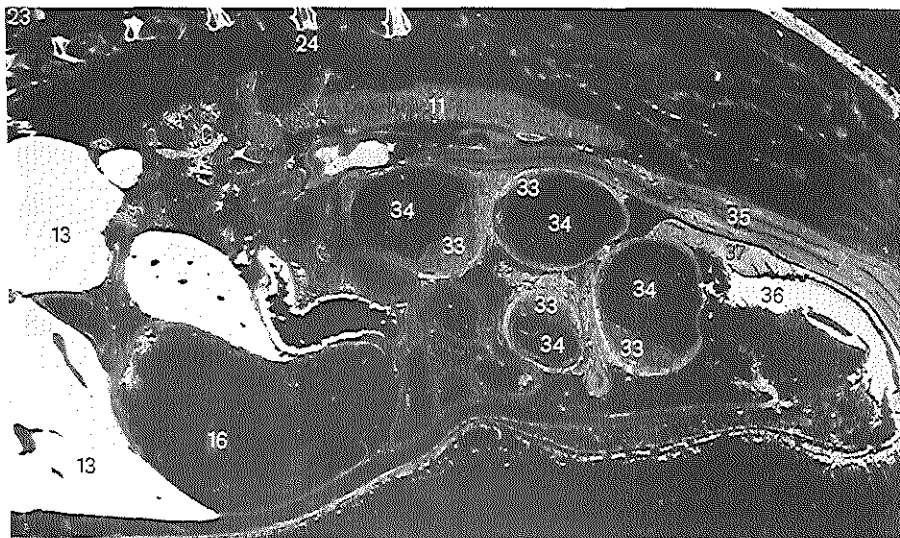


Fig. 50 - 13 dagen zwanger, 15 minuten na injectie (belichtingstijd 84 dagen).

4. Embryo's op dag 20

Hier geldt hetzelfde als voor embryo's van 13 dagen oud.

Na een belichtingstijd van 84 dagen ziet men nu echter zeer zwakke radioactiviteit in de skeletstructuren van het foetus, merkwaardigerwijs niet in de lever of de nier zoals bij het moederdier (fig. 51).

Conclusie

In een vroeg stadium der placentatie (7 dagen) dringt Myc 1080-C¹⁴ in de vrucht door, maar het is niet uit te maken of dit gelokaliseerd is in de primitieve placenta dan wel in het foetus. In latere stadia (13 en 20 dagen) vormt de placenta een vrijwel onoverkomelijke barrière voor de stof.

Deze resultaten zijn geheel in overeenstemming met farmacologische en klinische bevindingen (Hoofdstuk VIII).

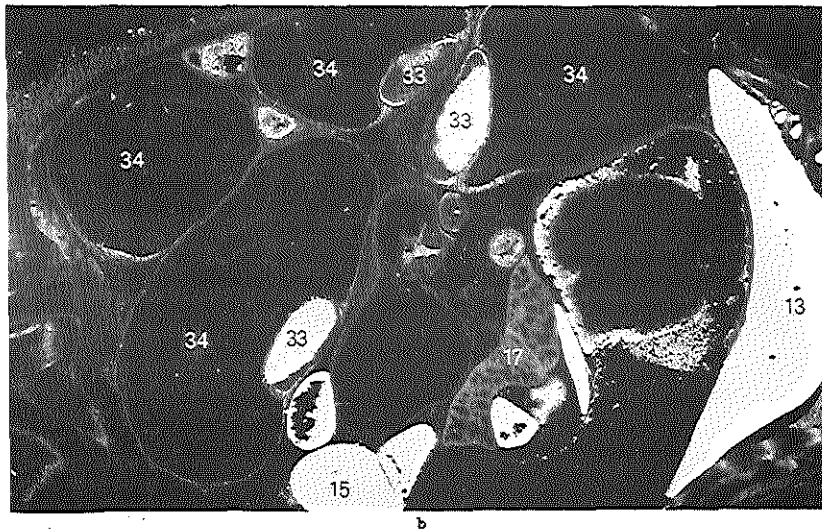


Fig. 51 - Detailvergroting. 20 dagen zwanger, 4 uur na injectie, coupe (a) en autoradiogram (b) (belichtingstijd 34 dagen).

3. Proeven met katten

Bij katten werd op dezelfde wijze als bij ratten het radioactiviteitsverloop in het bloed bepaald. De curven waren qua vorm vrijwel identiek aan die gevonden bij ratten.

4. Proeven met honden

Na toediening van 5 mg/kg Myc 1080 aan 2 mannelijke beagles werd de eliminatie van radioactiviteit via urine en faeces gedurende 40 dagen nagegaan. Gevonden werd een uitscheiding met de urine van 18% der toegediende radioactiviteit gedurende deze periode en een uitscheiding via de faeces van 66% gedurende de eerste 7 dagen. Een deel der radioactiviteit wordt ook bij de hond zeer langzaam uitgescheiden. Chromatografische analyse van de urine leverde in hoofdzaak een produkt, dat alle kenmerken van Myc 1080 bezit.

5. Samenvatting

Het beeld, dat uit de beschreven proeven naar voren komt, kan worden omschreven als volgt:

- 5.1. Er zijn geen duidelijke aanwijzingen gevonden voor een biotransformatie van Myc 1080 bij rat en hond.
- 5.2. De korte werkingsduur bij rat, kat en hond hangt samen met een snelle redistributie van de stof, waardoor de plasmaspiegel snel daalt onder een voor eindplaatremming kritische waarde.
- 5.3. De redistributie wordt veroorzaakt door stapeling in lever en nier, waaruit de stof met urine en via gal met de faeces wordt geëlimineerd.
- 5.4. Deze eliminatie geschiedt traag en met verschillende halfwaardetijden.
- 5.5. De stof wordt waarschijnlijk aan negatief geladen moleculen van bind- en steunweefsel (zure mucopolysacchariden) gebonden.
- 5.6. De placenta is evenals de bloed-hersenbarrière vrijwel ondoorgankelijk voor Myc 1080.

6. Onderzoek naar de lokalisatie in het muizediafragma volgens de methode van Waser

In 1957 beschreef Waser (1) een autoradiografische methode, waarmee de lokalisatie van gelabelde curare-achtige verbindingen in het eindplaatgebied van het muizediafragma kan worden bestudeerd.

Het autoradiogram van het diafragma van een muis, die enige tijd tevoren i.v. is ingespoten met een radioactieve curare-achtige stof, toont een cirkelvormige band van zwarte vlekjes - naar het schijnt één vlekje per spiervezel - op plaatsen van hoge cholinesterase-concentratie, hetgeen blijkt uit het feit, dat met een speciale kleuringsmethode voor dit enzym, beschreven door Koelle (2), analoge vlekjes zichtbaar worden ongeveer op de plaatsen van hoge radioactiviteit. De conclusie lijkt gerechtvaardigd, dat de stof zich ophoopt in het eindplaatgebied, waarmee natuurlijk niet gezegd is, dat de autoradiografische vlekken afbeeldingen zijn van de receptoren. Het eindplaatgebied is rijk aan zure mucopolysacchariden. In dit hoofdstuk (2.2.6.) werd reeds aannemelijk gemaakt, dat Myc 1080 affiniteit bezit voor deze macromoleculen. Daarom werd besloten enkele preparaatjes volgens de Waser-techniek te maken, om te zien of Myc 1080-C¹⁴ zich ook inderdaad in het eindplaatgebied ophoopt.

Methode

Myc 1080-C¹⁴ werd onder phenobarbital-anesthesie (50 mg/kg i.v.) intraveneus gespoten, opgelost in fysiologisch zout, in muizen van ongeveer 27 gram. De dosis bedroeg 4 mg/kg. De N. ischiadicus werd elektrisch geprikkeld en de contracties van de M. gastrocnemius werden isotonisch geregistreerd. Tijdens de verlamingsperiode werden de dieren kunstmatig beademd.

De verschillende muizen werden gedood door verbloeding 2½, 10, 15, 20, 30, 40, 60 en 120 minuten na toediening van de stof. Na het verbloeden werd snel het diafragma uitgeprepareerd en opgespannen op speciaal daartoe vervaardigde, ringvormige houders, zoals beschreven door Waser. Na enige dagen drogen aan de lucht werden de diafragma's losgesneden en in contact gebracht met fotografische platen. Na 2 weken belichten werden de platen ontwikkeld. Daarna werden de diafragma's gekleurd volgens de methode van Koelle en Friedenwald. Hierbij trad soms aanzienlijke vervorming op, zodat de overeenkomst tussen het autoradiogram en het Koelle-preparaat niet altijd even fraai is.

(1) Waser, P.G. & Lüthie, U., Arch.Int.Pharmacodyn.Ther., 112 (1957), 272.

(2) Koelle, G.B. & Friedenwald, J.S., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 70 (1949), 617.

Resultaten

Van alle tijdstippen zijn de afbeeldingen 52 en 53 gekozen als representatief voor een korte (10 minuten) en een lange inwerkingsduur (120 minuten) van Myc 1080. Op elke afbeelding staan het autoradiogram, het Koelle-preparaat en de contractiecurve van de M. gastrocnemius. Na 10 minuten is het dier nog compleet verlamd en moet de concentratie Myc 1080 in het diafragma meer dan voldoende zijn voor een volledige paralyse. Na 120 minuten zijn de contracties weer tot een nieuw maximum teruggekeerd.

Als men aanneemt, dat dit ook het geval zal zijn voor de contracties van het diafragma, moet de concentratie Myc 1080, althans op de receptoren zover gereduceerd zijn, dat contracties, dus adembewegingen, weer mogelijk zijn.

Dit laatste bleek inderdaad het geval, geoordeeld naar de spontane thorax-ademhaling. Strikt genomen is hiermee niet gezegd, dat ook het diafragma weer werkte.

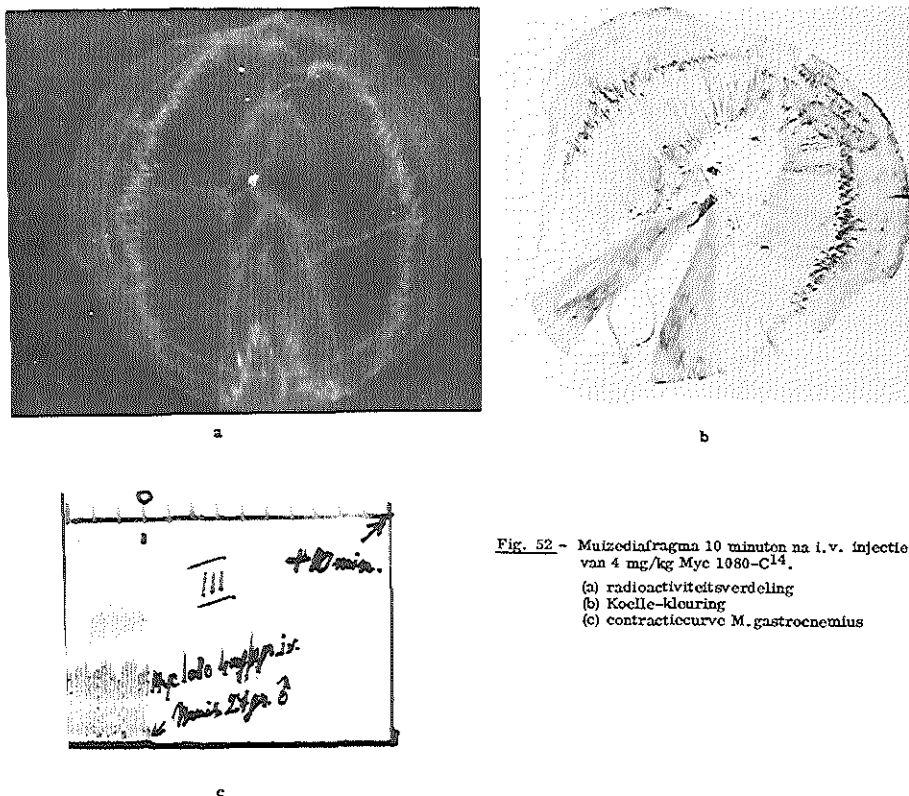


Fig. 52 - Muizediafragma 10 minuten na i.v. injectie van 4 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.
(a) radioactiviteitsverdeling
(b) Koelle-kleur
(c) contractiecurve M. gastrocnemius

Discussie

Vergelijkt men de zwarting van de autoradiogrammen op deze (en ook op andere) tijdstippen, dan ziet men ze met de tijd enigszins toenemen en niet afnemen, zoals verwacht. Toegegeven moet worden, dat de zwarting niet microdensitometrisch is gekwantificeerd, maar het is gezien de duidelijke verschillen niet aannemelijk dat dit tot een andere conclusie zou leiden. Volgens Waser (1) keren de contracties reeds terug wanneer nog een vrij grote concentratie aan radioactieve stof in het eindplaatgebied aanwezig is. Dit betekent, aldus Waser, dat òf transmissie mogelijk is met een groot aantal receptoren bezet, òf een herverdeling optreedt binnen het eindplaatgebied, waarbij de stof de eigenlijke receptoren verlaat, maar macros-

(1) Waser, P.G., J.Pharm.Pharmacol., 2 (1960), 577.

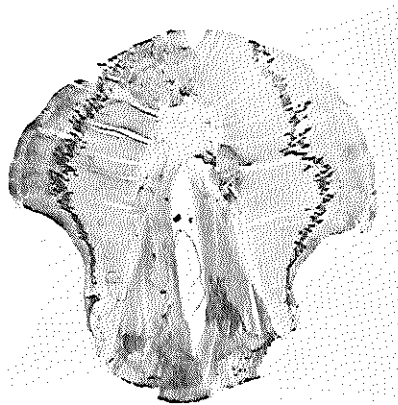
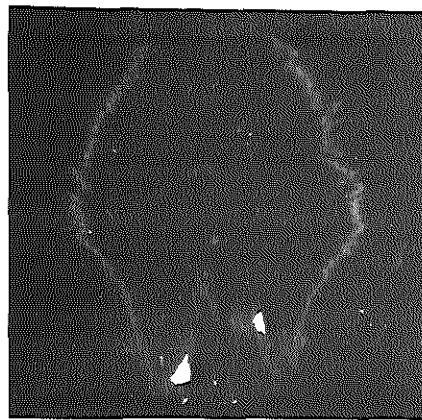
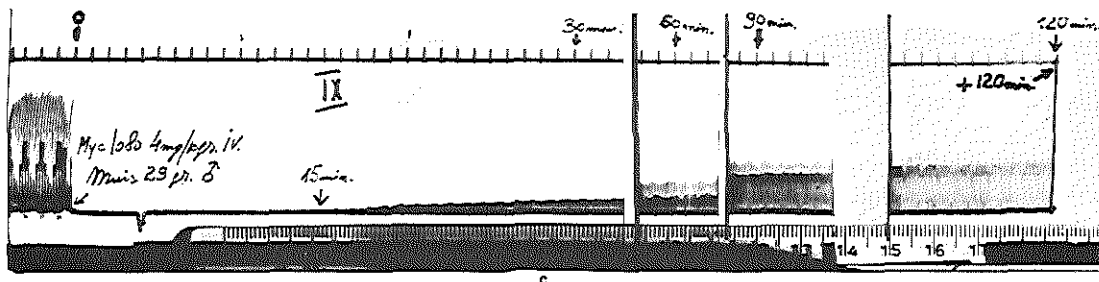


Fig. 53

Mulzediaphragma 120 minuten na i. v. injectie van 4 mg/kg Myc 1080-C¹⁴.

(a) radioactiviteitsverdeling
(b) Koele-kleuring
(c) contractiecurve M. gastrocnemius



copisch in het eindplaatgebied gelokaliseerd blijft. Nu is bij isotonisch registreren van de spiercontractie de contractiehoogte vrij snel weer bereikt. Daarvoor behoeft slechts een deel van de spiervezels te contraheren. De contractiekracht echter is direct afhankelijk van het aantal contraherende vezels. Als men een opstelling zou maken, waarbij men de contracties alternerend isotonisch en isometrisch zou registreren, mogen twee curven verwacht worden met een sterk verschillende tijdconstante. De isometrische registratie met de grotere tijdconstante zou de voorkeur verdienen, als men wil weten, hoeveel eindplaten wel en hoeveel nog niet doorgankelijk zijn. Als er dan bij volledige terugkeer van de contracties van alle vezels nog zwarting aanwezig is in het eindplaatgebied, is het vrij zeker, dat zij zich niet bevindt ter plaatse van de receptor, maar hoogstens in de buurt ervan.

Waser denkt als alternatieve verklaring ook aan een herverdeling. Dit zou impliceren, dat i. c. Myc 1080 zich eerst aan de receptoren en daarna aan aspecifieke moleculen bindt. Het is niet in te zien, waarom dit niet gelijktijdig zou kunnen geschieden, eventueel gevolgd door een herverdeling in de richting van de aspecifieke moleculen. De plekken van zwarting stellen dan van meet af aan de eindplaatgebiedjes voor, bestaande uit receptoren en andere moleculen (mucopolysacchariden), waaraan de stof zich gebonden heeft.

Het is denkbaar, dat er stoffen zijn die zich wel aan de aspecifieke moleculen binden en geen affiniteit hebben tot de receptoren. Verschilt het autoradiogram, hiermee verkregen, in wezen niet van dat van echte eindplaatremmers, dan mag men niet zeggen, zoals Waser doet, dat met zijn methode de receptoren gevisualiseerd worden. Proeven in deze richting staan op ons programma. In ons geval neemt de zwarting van het eindplaatgebied zelfs iets toe met de tijd, terwijl de contracties grotendeels zijn teruggekeerd. Dit klopt niet met de opvatting, dat de vlekken gevisualiseerde receptoren voorstellen.

In Hoofdstuk II is reeds opgemerkt, dat na denervatie van de spiervezel de gevoeligheid voor acetylcholine zich uitbreidt over de hele spiervezel, terwijl de nieuw gevormde receptoren met de techniek van Waser niet zichtbaar worden. Ook dit pleit tegen de opvatting van Waser.

Conclusie

Myc 1080-C¹⁴ bindt zich, zoals verwacht, in het aan mucopolysacchariden rijke eindplaatgebied.

HOOFDSTUK XI

INTERACTIE MET ENKELE ANDERE IN DE ANESTHESIE GEBRUIKTE STOFFEN

1. Inleiding

In Hoofdstuk IX werden enige beschouwingen gewijd aan de "biological availability" van geneesmiddelen. Hieruit bleek, dat de farmaceutische bereidingsvorm van grote invloed kan zijn op de werkzaamheid van het preparaat. Als voorbeeld werd genoemd, dat o.a. indifferente hulpstoffen de activiteit kunnen versterken of verzwakken. Is dit een belangrijk medisch-farmaceutisch probleem, van geheel andere aard is de wederzijdse beïnvloeding van de werkzaamheid resp. toxiciteit van twee of meer actieve stoffen, hetzij in een combinatiepreparaat, hetzij in afzonderlijke preparaten gelijktijdig toegediend.

Terecht worden tegenwoordig eisen gesteld ten aanzien van de "biological availability" van de bereidingsvormen van verpakte geneesmiddelen. Dergelijke eisen worden niet gesteld aan het gebruik van combinaties. De registratie-autoriteiten volstaan met een grote terughoudendheid bij het toelaten van combinatiepreparaten. Maar als er ergens grote gevaren bestaan, dan is het in het gelijktijdig toedienen van verschillende geneesmiddelen. De bewijslast van de veiligheid en de werkzaamheid van combinaties kan men echter niet afwentelen op de industrie, behalve voor de door haar gebrachte combinatiepreparaten. Clinici kunnen echter naar eigen medische beroepsverantwoordelijkheid combineren wat zij willen. Tijdens de anesthesie van een patient gedurende operaties worden niet zelden 10 of meer stoffen intraveneus ingespoten. De natuur is mild. Als de clinicus combinaties van geneesmiddelen zonder voorafgaande farmacologische en toxicologische beproeving direct aan patienten toedient, aanvaardt hij een grote verantwoordelijkheid en stelt hij zichzelf voor een vrijwel onoplosbare experimentele situatie. Zelfs indien hij de beschikking heeft over een uitgebreid patientenmateriaal en betrouwbare meetmethoden, zal het bijzonder moeilijk zijn tot eenduidige conclusies te komen.

Het is niet eenvoudig dit probleem op te lossen. Zeker is, dat men moet proberen de patient zo weinig mogelijk preparaten tegelijk toe te dienen resp. voor te schrijven. Maar het zo absoluut te stellen als sommigen doen: nooit meer dan een enkel preparaat voorschrijven, is niet erg realistisch zolang niet vaststaat dat elke ziekte één enkele oorzaak heeft, die met één enkel middel te elimineren is. En zo dit al mogelijk is, zal men in het belang van de patient soms gelijktijdig met de causale een symptomatische therapie moeten toepassen. Bovendien kunnen combinaties van preparaten voor de patient vaak veiliger zijn. Als voorbeeld kunnen worden genoemd de combinatie van een eindplaatremmende stof met een algemeen anestheticum, mengsels van verschillende sulfonamiden of van sulfonamiden met bicarbonaat, combinaties van diuretica met K-preparaten, combinaties van PAS met INH en streptomycine etc. etc.

Toch zal de clinicus zich steeds weer bewust moeten zijn van mogelijke gevaren die aan het voorschrijven van meer dan één geneesmiddel tegelijk kunnen kleven.

Van de farmaceutische industrie mag geëist worden, dat zij het door haar op de markt gebrachte preparaat grondig heeft onderzocht op activiteit en veiligheid. Maar de bewijslast van de zin en de veiligheid van door clinici gecomponeerde combinaties berust bij de clinici. Deze dienen de empirische methode zoveel mogelijk te vermijden en zich meer dan tot nu

toe gebeurde met dierexperimenteel onderzoek te gaan bezighouden alvorens zij de bedachte combinaties op de mens toepassen. Zij zullen hierbij o.a. samenwerking moeten zoeken met universitaire farmacologen en toxicologen. In sommige gevallen zal de industrie aan dergelijke onderzoeken medewerking willen verlenen, maar zeker niet als regel. Natuurlijk doen veel patienten aan zelfmedicatie, ook tijdens een door de arts voorgeschreven andere therapie. Maar dat mag hen niet verhinderen te doen wat juist is.

Een werkzame stof kan met een andere werkzame stof op velerlei wijzen in interactie treden, bijvoorbeeld door aangrijpen op dezelfde receptor, door beïnvloeding van de circulatie, door interventie in de eliminatie etc. etc. Voor een indringend overzicht van wat alzo mogelijk is op het gebied van "Reduction of drug action by drug combination" zij verwezen naar Ariëns (1). De zaken worden verder nog gecompliceerd doordat verschillende stoffen in het algemeen verschillende farmacodynamische eigenschappen bezitten: resorptie, metabolisme en uitscheiding hebben verschillende tijdconstanten. De interacties zijn daardoor van moment tot moment anders. Bovendien kunnen gevormde metabolieten aanleiding geven tot nieuwe interacties. Eigenlijk zijn alleen in-vitro-modellen geschikt om de problemen iets fundamenteeler te benaderen.

Zo zijn isobolen in vitro goed bepaalbaar, maar in vivo wordt de bepaling gestoord door verschillende tijdconstanten en allerlei secundaire effecten. Hiervoor zouden de isobolen moeten worden uitgebreid tot een driedimensionaal systeem. Interacties van een eindplaatremmer met andere stoffen ter plaatse van de eindplaat kan men bijvoorbeeld goed bestuderen met het Bülbring-preparaat in vitro, maar in vivo kunnen de resultaten kwalitatief of kwantitatief geheel verschillend zijn door beïnvloeding van de spierdoorstroming e.d., maar ook doordat, anders dan in vitro, met eliminatie van de stoffen rekening moet worden gehouden.

Bij het klinisch onderzoek van een nieuwe motorische-eindplaatremmer kunnen allerlei interacties met andere in de anesthesie gebruikte stoffen optreden. De anesthesist zal daarom graag tevoren enige informatie hebben over de invloed van andere door hem gebruikte stoffen op parameters, zoals hartfrequentie en bloeddruk, maar ook op de werkingsduur van Myc 1080 zelf. Dergelijke interacties zijn hem voor andere perifere spierrelaxantia grotendeels bekend.

Ten behoeve van de clinici die de eerste proeven bij patienten hebben ondernomen werd daarom een aantal oriënterende proeven gedaan met enkele stoffen van de vele, die tijdens operaties aan de patient kunnen worden toegediend. Het doel was slechts een indruk te krijgen of en in hoeverre Myc 1080 zich in zulke combinaties onderscheidt van andere competitieve eindplaatremmers. Vergelijking met referentiestoffen (gallamine, alcuronium o.i.d.) werd nagelaten. De waarnemingen werden meestal gedaan in verscheidene proeven. Hiervan zal steeds een enkele proef model staan en de resultaten zullen, voor zover een niet al te grondig literatuuronderzoek toeliet, met literatuurgegevens worden vergeleken. De interpretatie wordt grotendeels aan de anesthesist overgelaten. De proeven werden zo eenvoudig mogelijk opgezet. Het was zeker niet de bedoeling een uitgebreide studie over interacties uit te voeren. Dat zou voldoende stof opleveren voor een aparte monografie.

Bij de keuze van de af te beelden curven verkregen bij kat of hond werd enige selectie toegepast. Toen dit hoofdstuk werd geschreven, was al uit de kliniek bekend, dat de stof bij een aantal patienten tachycardieën gaf.

Bij de selectie van Myc 1080 uit de reeks der conessine-derivaten was dit fenomeen in enige, echter lang niet in alle gevallen waargenomen. De frequentiestijging bedroeg in het algemeen niet meer dan 10%. Ook bloeddrukveranderingen van deze orde werden gezien. Dit alles bij doseringen tot 2 à 3 maal de RD_{90} . De omvang van deze veranderingen werd zeker acceptabel geacht. De kliniek leerde echter, dat de frequentie-veranderingen bij de mens soms veel groter waren dan 10%, mogelijk door allerlei interacties; bloeddrukeffecten werden echter niet gezien.

(1) Ariëns, E. J., J. Mond. Pharm., 12 (1969), nr. 3, 263.

In de hierna beschreven interactieproeven werden daarom, indien aanwezig, die proeven geselecteerd, waarbij frequentie-effecten werden gezien.

Omdat de stof intussen op grond van de tachycardieën bij de mens uit het klinische experiment is teruggetrokken, zijn geen verdere proeven meer gedaan om achter de oorzaak van de tachycardie te komen, te minder daar ook in het proefdier dit verschijnsel slechts incidenteel gezien wordt. Soms ziet men hierbij zelfs tijdelijke bradycardieën of bifasische effecten.

De te beschrijven invloeden van sommige stoffen op de tachycardie lenen zich slecht voor het ophelderen van de farmacologische oorzaak van de tachycardieën. Hiervoor zijn gerichte proeven in vitro en in vivo nodig.

Van enkele andere eindplaatremmers is eveneens een tachycarde werking bekend. Van gallamine berust deze op een vagolytische werking (1) gepaard aan een versterking van de vrijmaking van noradrenaline uit de adrenerge uiteinden in het hart (2); voor pancuronium is een specifieke cardiovagolytische werking aangetoond (3,4).

Mogelijk berust de Myc 1080-tachycardie op dezelfde mechanismen. Immers, Myc 1080 bezit een ganglionblokkerende ($pA_2 = 6,34$) en een anti-muscarine-werking ($pA_2 = 5,94$) (Hoofdstuk VIII), terwijl de stof op het geïsoleerde vas deferens een eigen spasmogene werking bleek te bezitten, echter pas in concentraties vanaf $10^{-4,5}$ M. Aangezien de marge tussen ganglionblokkerende en cholinesteraseremmende, dus ganglionstimulerende, dosis klein is (Hoofdstuk VII), moet onder bepaalde omstandigheden echter ook rekening gehouden worden met de mogelijkheid van een ganglionstimulering, zich uitend in een sympathomimetisch effect door de reeds bij lagere dosis optredende anti-muscarine-werking van Myc 1080. In overeenstemming met deze verklaring voor de tachycardie is het feit, dat Myc 1080 op het geïsoleerde rattehart in de Langendorff-opstelling geen enkele invloed heeft op de parameters frequentie, contractiekracht, ECG en coronairdoorstroming. Propranolol is in staat de tachycardie bij de mens te antagoneren.

Een deel van de in de volgende proeven gevonden interacties kan op basis van deze gegevens worden verklaard, maar er zijn te veel onzekerheden om een gefundeerde uitspraak te wettigen.

2. Methodiek

2.1. In vivo

Gebruikt werd het N-tibialis-M-gastrocnemius-preparaat van de kat en de hond zoals beschreven in Hoofdstuk V.

2.2. In vitro

Het N-phrenicus-diafragma-preparaat van de rat volgens Bülbring (5) werd opgehangen in een orgaanbad van 75 ml, waarin Tyrode volgens Meyler (6), waarvan de hoeveelheid glucose was verdubbeld. De vloeistof werd doorborreld met carbogeen reeds voordat het in het orgaanbad werd toegelaten en ook nog tijdens de proef.

De elektrische prikkel, toegediend op de zenuw, bestond uit treintjes van rechthoekige prikkels één maal per 8 sec gegeven. Elk treintje bestond uit 25 rechthoekige pulsen van

(1) Riker, W.F.Jr. & Wescoe, W.C., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 54 (1951), 373.

(2) Brown, B.R. & Crout, J.R., *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 172 (1970), 266.

(3) Bonta, I.L., Goorissen, E.M. & Derkx, F.H., *Eur.J.Pharmacol.*, 4 (1968), 83.

(4) Saxena, P.R. & Bonta, I.L., *Eur.J.Pharmacol.*, 11 (1970), 332.

(5) Bülbring, E., *Brit.J.Pharmacol.*, 1 (1946), 38.

(6) Meyler, F.L., *Dissertatie* (1960), Amsterdam.

2 msec duur en een frequentie van 100 Hz. De prikkelsterkte was steeds supramaximaal (0,4 - 1 V). De contracties werden geregistreerd via een verplaatsingstransducer op een Hellige-polygraaf. De penschrijvers hiervan maken via schrijfmachinelint afdrukken op ruitjespapier. De aldus verkregen curven lenen zich slecht voor directe reproductie. Hieronder zijn daarom afgebeeld lijnen, getekend langs de toppen van de uitslagen, zodat de veranderingen van de contractiehoogte duidelijk zichtbaar zijn.

Procedure

Na een adaptatieperiode van 30 min werd Myc 1080 toegevoegd in een dosis die iets meer dan 50% uitdoving gaf. Vijf minuten hierna werd de op interactie te onderzoeken stof toegediend. Na wederom een inwerkingsduur van 5 minuten werd de kymograaf stilgezet en werd de badvloeistof enige malen verversst, totdat de contracties weer ongeveer teruggekeerd waren of op een nieuw constant niveau gehandhaafd bleven. Hierna herhaalde zich het proces.

3. Experimenteel gedeelte

SUCCINYLCOLINE

Ofschoon een van de doelstellingen bij het ontwikkelen van een nieuw perifeer werkend spierrelaxans was het vinden van een stof die zo snel en volledig inwerkt, dat intubatie bij de mens mogelijk is zonder dat succinylcholine vooraf behoeft te worden gegeven, is toch een interactieproef met deze stof gedaan, omdat geen zekerheid bestond, dat dit doel ook werkelijk was bereikt.

1. In vivo

Een continu infuus bij een kat werd met zodanige snelheid gegeven, dat een permanente extinctie werd verkregen van ongeveer 90%. Intraveneuze injecties van enkelvoudige doseringen succinylcholine van 10, 20 en 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bleken het Myc 1080-block tijdelijk en dosisafhankelijk te antagoniseren.

De bloeddruk vertoonde hierbij slechts onbetekenende rimpeltjes. De frequentie werd niet geregistreerd (fig. 54).

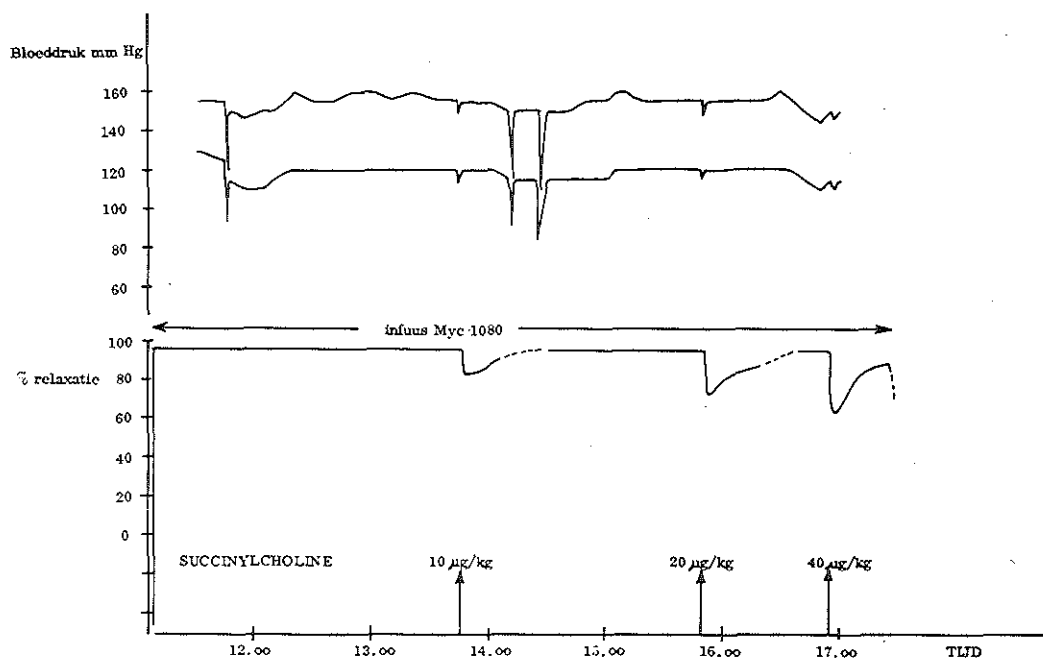


Fig. 54 - Kat, φ 2,8 kg. Interactie succinylcholine - Myc 1080. Bloeddruk; relaxatie.

2. In vitro

Doseringen van 5-100 µg toegevoegd aan het orgaanbad gaven een dosisafhankelijke uitdoving van de spiercontractie. Doses lager dan 5 µg hadden geen waarneembaar effect.

Na een partiëel neuromusculair block van 50%, teweeggebracht door 0,2 mg Myc 1080, bleken al deze doseringen succinylcholine het Myc 1080-block te versterken.

3. Discussie

In zijn proefschrift maakt Linssen (1) aannemelijk, dat bij proeven in vivo (*N-peroneus-M-tibialis*-preparaat van de kat) tijdens een gallamine-infuus dat eenpartieel block veroorzaakt, een kleine dosis succinylcholine dit block tijdelijk antagoneert, terwijl grote doses succinylcholine het block versterken, daarbij tevens een niet-depolariserend type block vervangend door een depolariserend. In iets andere bewoordingen komt zijn motivering op het volgende neer: een dosis succinylcholine, gegeven tijdens een gallamine-infuus, verdringt, in samenwerking met de door faradische prikkeling van de zenuw aan het zenuwuiteinde vrijkomende acetylcholine, een deel van het gallamine van de receptoren. Deze zijn nu beschikbaar voor bezetting door succinylcholine of acetylcholine. Is de dosis succinylcholine laag, dan wint het acetylcholine de strijd om de bezetting, doordat de affiniteit van acetylcholine voor de receptor groter is dan die van succinylcholine. Dit heeft een effectieve spiercontractie tot gevolg, hetgeen zich manifesteert in een antagonisme van het gallamine-block; is echter de succinylcholine-dosis hoog, dan zal de vrijgekomen receptor bezet worden door succinylcholine met als gevolg een depolariserend block, zich uitend in versterking van het gallamine-block.

In vivo werd in de door ons gebruikte doseringen geen spoor van een versterking van het block gezien. Dit was ook niet te verwachten, omdat de hoogste dosering van 40 µg/kg ongeveer overeenkwam met de laagste door Linssen gebruikte dosis van 0,4 µmol per kat (= 0,1 µmol/kg), die ook bij Linssen een antagonisme te zien gaf. De opzet van onze proef was evenwel het antagonistische effect vast te stellen. Hogere doseringen succinylcholine werden daarom niet gebruikt.

In vitro werd uitsluitend synergisme gevonden, terwijl toch het dosisgebied van succinylcholine varieerde van 5 µg, een dosis die op zichzelf de contractie reduceert met 3%, tot 100 µg, een dosis die 90% reductie van de niet door Myc 1080 geïnhibeerde spiercontracties veroorzaakt.

Uit onlangs gepubliceerde proeven van Derkx et al. (2) blijkt, dat het succinylcholine-effect bij de rat geantagoneerd wordt door neostigmine. Succinylcholine gedraagt zich ook in hun proeven blijkbaar als een niet-depolariserende stof bij rattespieren.

ATROPINE

1. In vivo

Omdat atropine praktisch bij elke anesthesie wordt gebruikt, werd bij de hond een serie proeven gedaan met de combinatie atropine-Myc 1080 in allerlei dosisverhoudingen, beide i.v. toegediend. Bij elke proef werd steeds een half uur vòòr een telkens hogere dosis Myc 1080 (0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 - 6,4 mg/kg) een constante hoeveelheid atropine gespoten. In de opeenvolgende proeven werd steeds een hogere dosis atropine gebruikt (resp. 0,1 - 0,4 - 0,8 - 1,6 en 5 mg/kg).

Tenslotte werd nog een proef gedaan met een constante hoeveelheid Myc 1080 (3 mg/kg) en een stijgende hoeveelheid atropine (0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 mg/kg). Deze laatste proef is afgebeeld in fig. 55.

(1) Linssen, G.H., Academisch Proefschrift, (1961), Nijmegen.

(2) Derkx, F.H.M., Bonta, I.L. & Lagendijk, A., *Eur. J. Pharmacol.*, 16 (1971), 105.

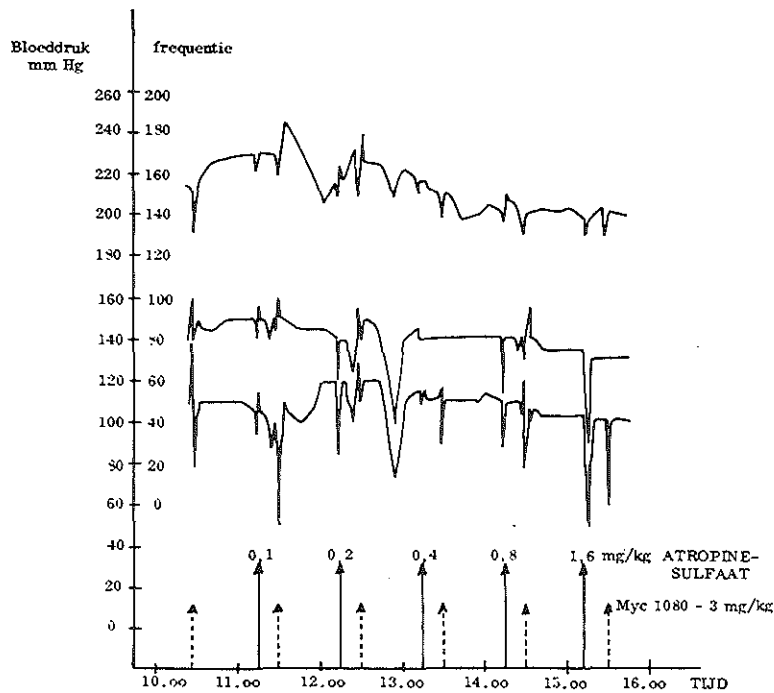


Fig. 55 - Interactie atropine-sulfaat - Myc 1080. Hond ♂ 10,5 kg.

Bij deze proeven werd uitsluitend gelet op eventuele interacties met bloeddruk en hartfrequentie. Er werden geen invloeden van betekenis gevonden. In enkele andere proeven werd de invloed nagegaan van 2 mg/kg atropine op relaxatie en/of T_{50} bij de hond (1 mg/kg Myc 1080) en de kat (0,2 mg/kg Myc 1080). Er werd slechts een aanduiding van een synergisme gevonden.

2. In vitro

Uit fig. 56 blijkt duidelijk, dat atropine een eigen werking bezit (2 en 4 mg) en de relaxatie door 0,15 mg Myc 1080 versterkt.

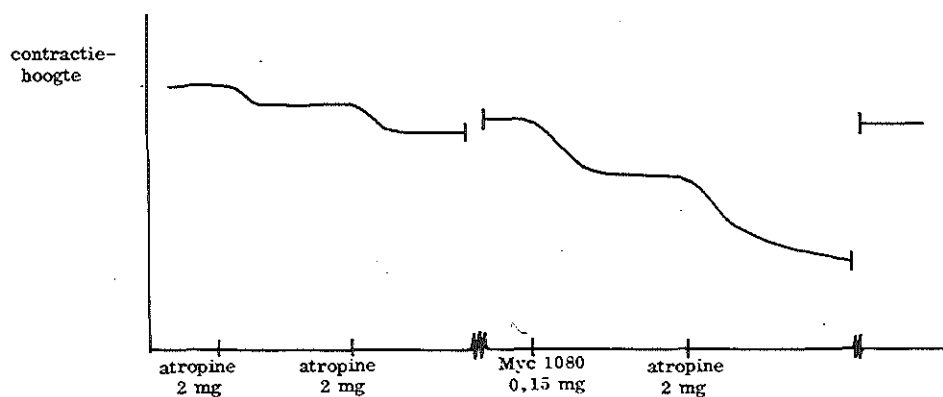


Fig. 56 - Interactie atropine - Myc 1080. N.phrenicus-diafragma in vitro.

3. Discussie

De resultaten stemmen ongeveer overeen met de verwachtingen, ofschoon in vivo op een duidelijker synergisme t. a. v. de relaxatie gerekend had mogen worden. In de literatuur van de laatste 10 jaar hebben wij geen gegevens gevonden over analoge proeven met andere motorische-eindplaatremmers. Dit komt waarschijnlijk doordat zowel in het dierexperiment als in de anesthesie het gebruik van atropine algemeen gangbaar is.

ETHER

1. In vivo

De gebruikelijke parameters werden geregistreerd bij de pentobarbital-hond (géén N_2O-O_2) na 0,6 mg/kg Myc 1080, een submaximale dosering, zonder en tijdens toediening van ether in verschillende standen van de etherverdamer (fig. 57).

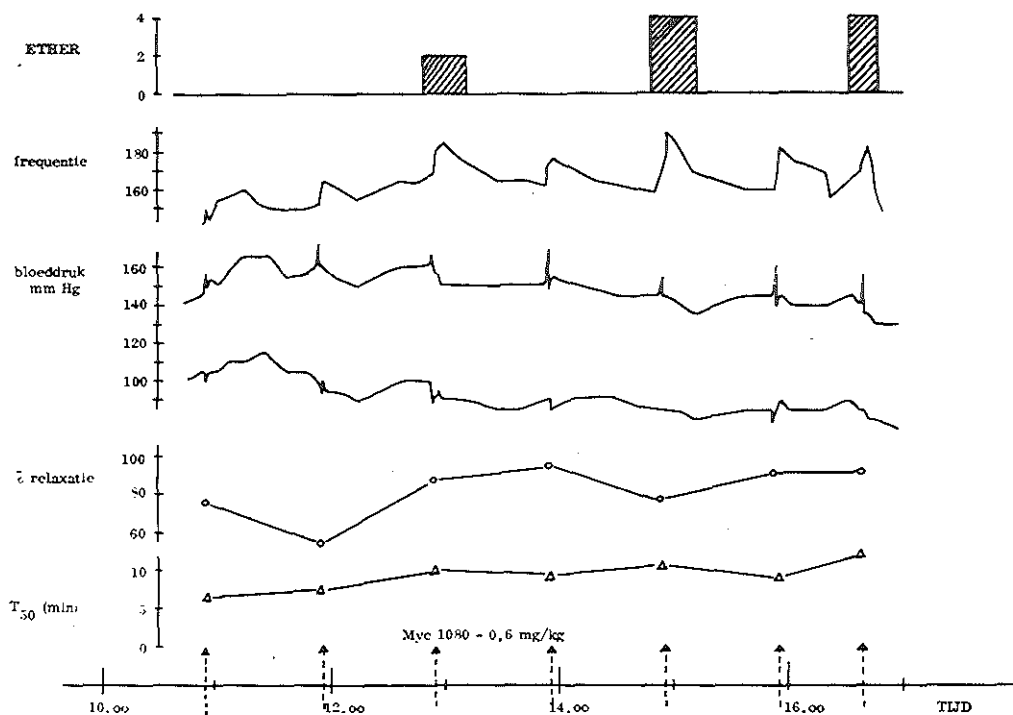


Fig. 57 - Interactie ether - Myc 1080. Hond ♀ 8,5 kg.

Stand 2 komt overeen met 6% ether in het gasmengsel, stand 4 met 17%.

Myc 1080 alleen gaf een geringe tachycardie, die met ether verergerde. Er werden geen invloeden op de bloeddruk waargenomen.

De invloed van ether op de door Myc 1080 veroorzaakte relaxatie van de M-tibialis-contracties kan als volgt worden omschreven. De relaxatie neemt met ongeveer 20% toe tijdens de eerste ether-toediening. In de blanco periode tussen de eerste twee ether-toedieningen keerde de werking van Myc 1080 niet tot de uitgangswaarde terug. Het paralytische effect van Myc 1080 nam tijdens het verloop van de proef niet verder toe. De T_{50} -waarden werden tijdens elke episode van ether-toediening iets groter.

2. In vitro

Toevoeging aan de badvloeistof van 0,2 ml ether gaf een kortdurende daling van de contractiehoogte (fig. 58). De spontane terugkeer tot de normale hoogte kan worden verklaard, door-

dat het doorborrelende carbogeen de ether uit de badvloeistof verdrijft. Secher (1) kon een volledig block verkrijgen door continue toevoer van ether aan de badvloeistof. Na een partiële verlamming door 0,5 mg Myc 1080 werd een tijdelijke versterking van dit Myc 1080-effect gezien na toediening van 0,1 ml ether.

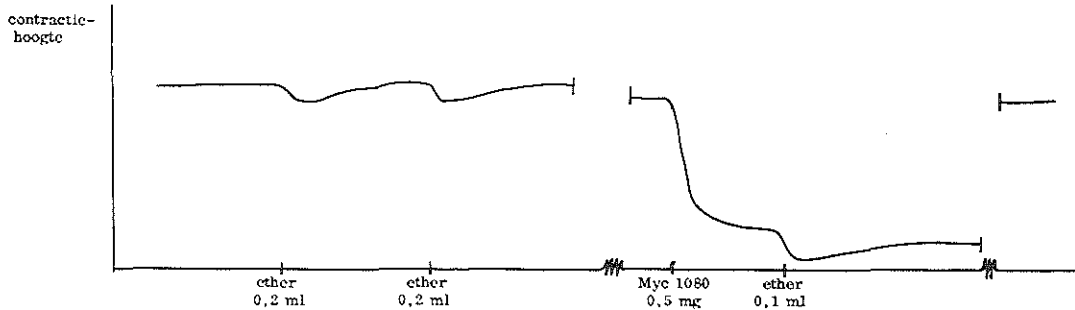


Fig. 58 - Interactie ether - Myc 1080. N.phrenicus-diafragma in vitro.

3. Discussie

De bevindingen met Myc 1080 bij de hond komen ongeveer overeen met die van Katz (2) met d-tubocurarine bij de kat. Hij vond dat ether in concentraties van 5 tot 25% in de beademingslucht de twitch-depressie van 50-200 µg/kg d-tubocurarine alleen vergrootte met 10-30%, terwijl de T_{50} toenam.

De voornaamste oorzaak van de potentiërende werking van ether in de anesthesie moet gezocht worden in zijn werkingen op het CZS. Dit kon noch bij de proeven van Katz noch bij onze proeven tot uiting komen, omdat de prikkel werd toegediend op een perifere zenuw. De onder deze omstandigheden optredende versterking van het effect van d-tubocurarine, resp. Myc 1080, stelt weinig voor. Uit de proef in vitro blijkt, dat er wèl een effect bestaat op de neuromusculaire overdracht. De aard van deze werking is nog niet helemaal duidelijk. Katz geeft in het geciteerde artikel een uitgebreid overzicht van de proeven en hypothesen van anderen. Het feit dat ether eveneens het effect van succinylcholine versterkt en dat bij "close intra-arterial injection" van 2-6 ml/kg 5%-ige etheroplossing in fysiologisch zout een block teweeggebracht wordt, dat gekarakteriseerd wordt door een "poorly sustained tetanus and post-tetanic facilitation", eigenschappen van een niet-depolariserend block, dat echter niet geantagoniseerd kon worden door edrophonium of neostigmine (Katz), maakt het moeilijk de werking van ether te classificeren in de in Hoofdstuk III beschreven werkingstypen. Secher (3) vond met het Bülbring-preparaat, dat neostigmine en eserine in lage doses het ether-block antagoneeren, maar het in hogere doses juist versterken.

De iets sterkere tachycardie van Myc 1080 tijdens de episodes van ethertoediening berust op een synergisme met de eigen tachycarde werking van ether (vagusblokkade en sympathomimetisch effect).

- (1) Secher, O., Acta Pharmacol. Toxicol., 6 (1950), 371.
 (2) Katz, R.L., Anaesthesiol., 27 (1966), 52.
 (3) Secher, O., Acta Pharmacol. Toxicol., 7 (1951), 103.

LACHGAS

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Tijdens een pentobarbital-infuus werd een hond met tussenpozen van 40 minuten beademd met afwisselend N_2O/O_2 en N_2/O_2 in de verhouding 7:3. Op deze wijze werd de O_2 -spanning constant gehouden en werd N_2 afgewisseld met N_2O .

Myc 1080 0,6 mg/kg i.v. werd steeds gegeven 15 minuten na de wisseling van het gasmengsel.

Er werden geen duidelijke effecten op bloeddruk of hartfrequentie waargenomen. De T_{50} veranderde in het geheel niet (fig. 59).

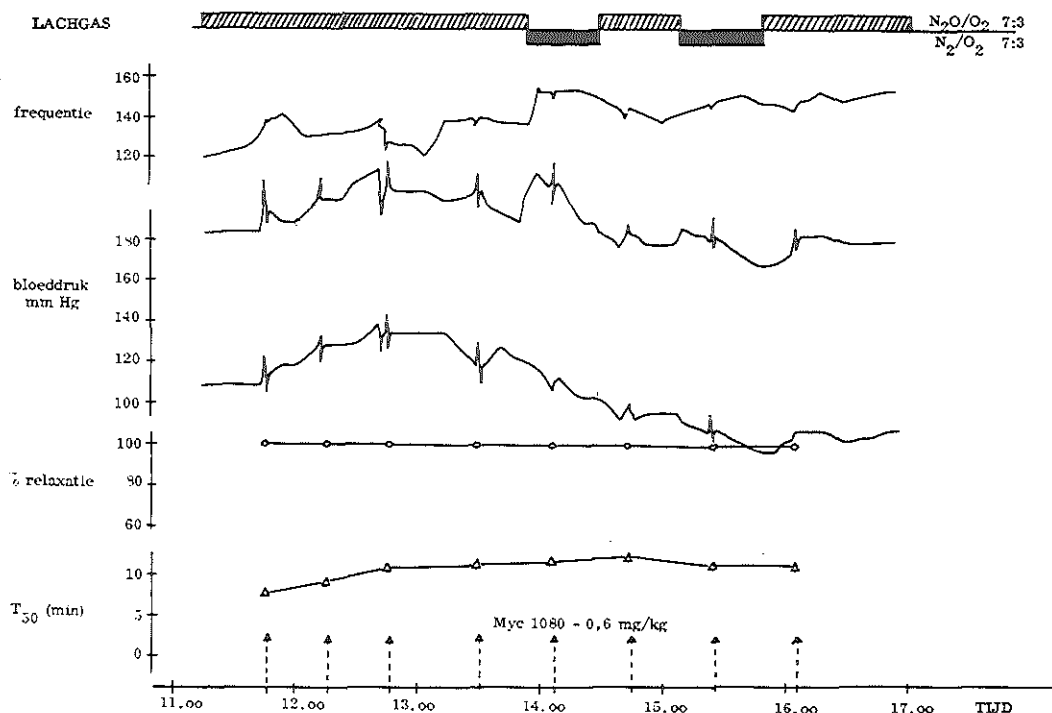


Fig. 59 - Interactie lachgas - Myc 1080. Hond ♂ 9,0 kg.

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

De proef, maar nu met de kat, was identiek aan de onder 1.1. beschrevene, maar de dosering Myc 1080 bedroeg 0,15 mg/kg, leidend tot een relaxatie van ongeveer 60%.

Behalve een geringe frequentiestijging bij elke dosis Myc 1080 werden geen invloeden op bloeddruk of hartfrequentie gevonden. De relaxatie veranderde niet onder invloed van N_2O , evenmin de T_{50} (fig. 60).

2. In vitro

Doorborreling van de badvloeistof met lachgas 0,4 l/min naast de gewone carbogeedoorborreling, leidde tot een uitdoving van ongeveer 30%. Een dosering van 0,25 mg Myc 1080 gaf eveneens een uitdoving van 30%. Lachgas 0,4 l per minuut + Myc 1080 0,25 mg gaf een additieve relaxatie van 60% (fig. 61).

Ook bij andere dosis-verhoudingen werd een zuivere additie gezien.

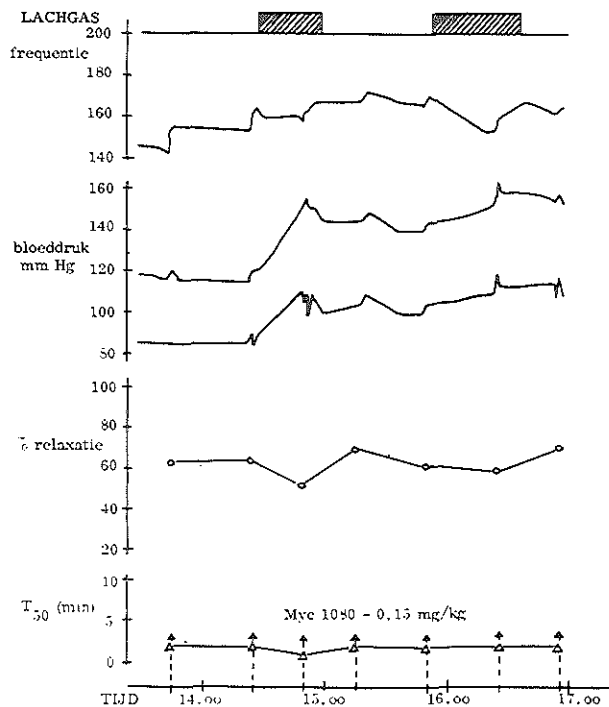


Fig. 60 - Interactie lachgas - Myc 1080. Kat ♂ 5,5 kg.

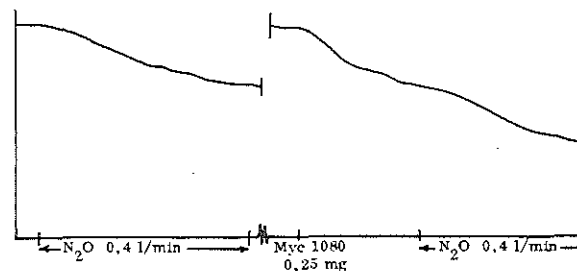


Fig. 61 - Interactie lachgas - Myc 1080. N. phrenicus-diaphragma in vitro.

3. Discussie

In de literatuur wordt vrijwel geen melding gemaakt van interactieproeven van lachgas met curare-achtige verbindingen.

Naess (1) vond bij konijnen geen invloed van lachgas op het myogram van de indirect geprikkelde spier, ook geen interactie van lachgas met curare.

Van de anesthesie wordt slechts gemeld, dat ether werd gebruikt tijdens het prepareren; de proef begon pas 1-1,5 uur na het stoppen van de ether-anesthesie. Hughes (2) vond bij de chloralose-kat geen eigen effect, maar wél een toename van het effect van curare en gallamine door 75% N₂O.

Hughes spreekt van een "significante" toename, maar ze is, gezien de afgebeelde curve in zijn artikel, niet indrukwekkend. Bloeddruk en hartfrequentie werden niet beïnvloed.

Onze resultaten in vitro wijzen op een perifeer remmend effect op de neuromusculaire overdracht bij de rat, maar dit effect wordt in vivo niet bevestigd.

Het is moeilijk al deze schijnbaar strijdige gegevens met elkaar te rijmen.

(1) Naess, K., Acta Physiol.Scand., 19 (1950), 187.

(2) Hughes, R., Brit.J.Anaesth., 42 (1970), 826.

HALOTHAAN

1. In vivo

1.1. Supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Onder invloed van halothaan 0,5 - 1,5 en 4,5% in het inademings-gasmengsel van N₂O-O₂ = 7:3 daalden bloeddruk en hartfrequentie zeer sterk, waarschijnlijk door de combinatie met het reeds aan het begin van de proef gegeven pentobarbital. Myc 1080 beïnvloedde deze dalingen nauwelijks. De T₅₀ nam toe: bij de beide laagste halothaan-doseringen met ongeveer 2½ minuten, bij de hoogste dosering met ongeveer 9 minuten (fig. 62).

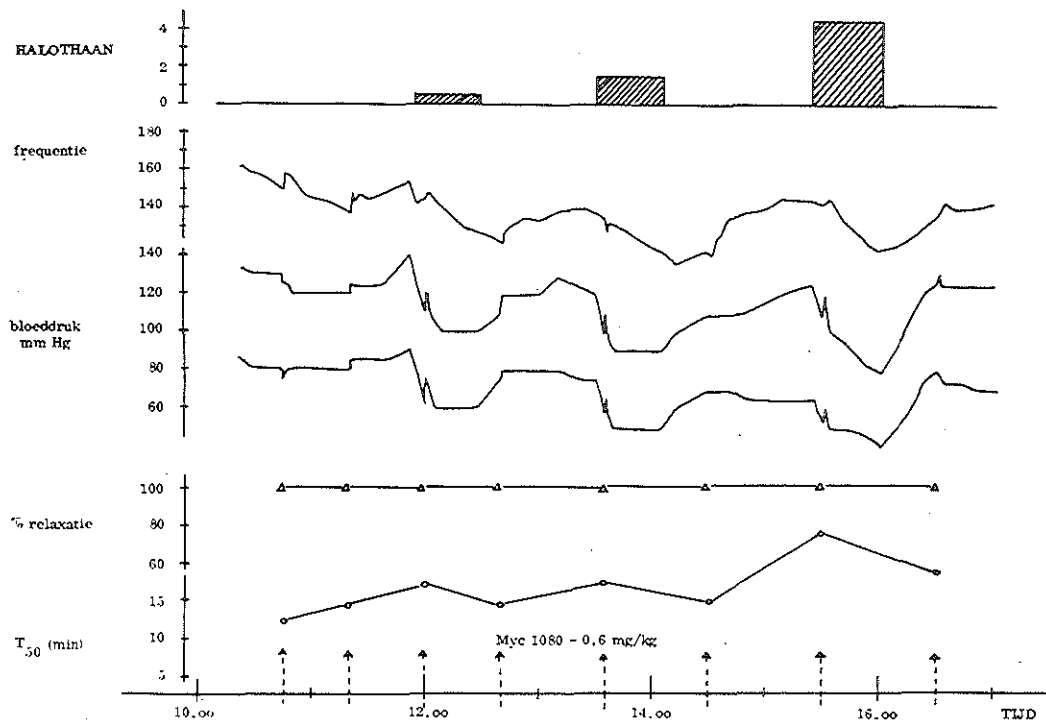


Fig. 62 - Interactie halothaan - Myc 1080. Hond ♂ 7,2 kg.

1.2. Submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

De bevindingen verschilden kwalitatief niet van die bij de hond (1.1.). Bovendien werd de relaxatie duidelijk synergistisch beïnvloed (fig. 63).

2. In vitro

Halothaan als vloeistof gespoten in de carbogeenstroom van het orgaanbadje veroorzaakt een relaxatie en versterkt de werking van Myc 1080 (fig. 64).

3. Discussie

Invloed van betekenis op de halothaan-hypotensie werd niet waargenomen. De synergistische werking met Myc 1080 op de relaxatie van de spiercontractie in vivo is ook beschreven voor de combinatie van halothaan met pancuronium (1) en met d-tubocurarine (2,3).

(1) Bonta, I.L., Goorissen, E.M. & Derkx, F.H., Eur.J.Pharmacol., 4 (1968), 83.

(2) Hughes, R., Brit.J.Anaesth., 42 (1970), 826.

(3) Katz, R.L., Anaesthesiol., 28 (1967), 564.

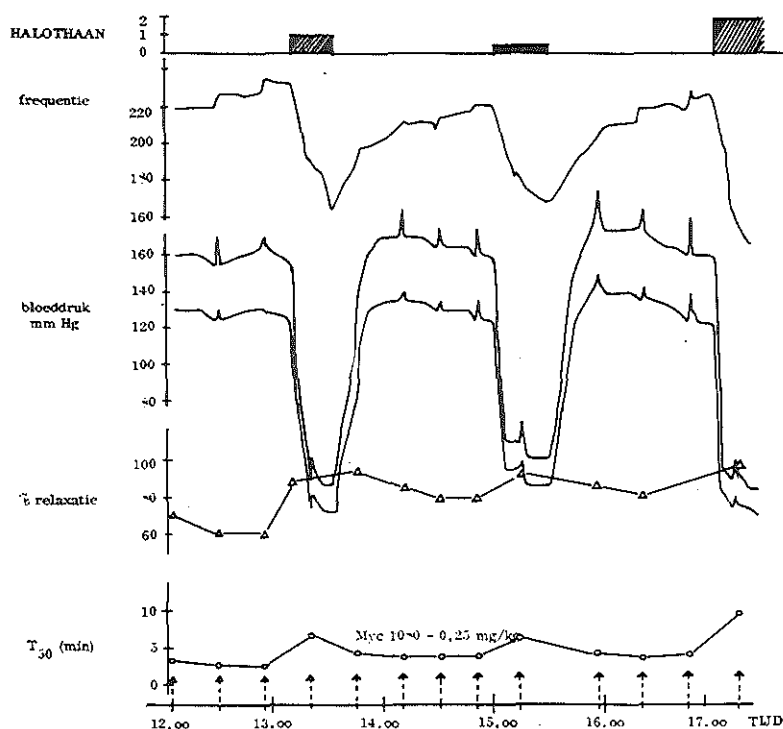


Fig. 63 - Interactie halothaan - Myc 1080. Kat φ 3,2 kg.

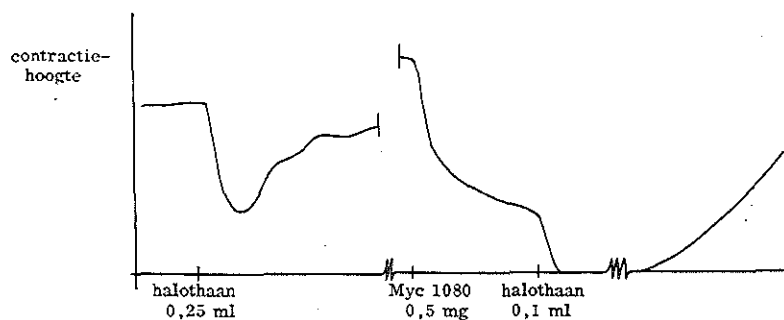


Fig. 64 - Interactie halothaan - Myc 1080. N.phrenicus-diafragma in vitro.

In dit opzicht vertoont Myc 1080 dus goede overeenkomst met de genoemde eindplaatremmers.

MORFINE-HCl

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Uit fig. 65 blijkt, dat - zoals te verwachten was - morfine 1 mg/kg een sterke tensie- en frequentiedaling gaf. De geringe polsversnelling door Myc 1080 1 mg/kg vòòr de morfine-toediening werd veel sterker, zonder echter het oorspronkelijke frequentieniveau te overschrijden.

Van een verlenging van de T_{50} was niets te bespeuren.

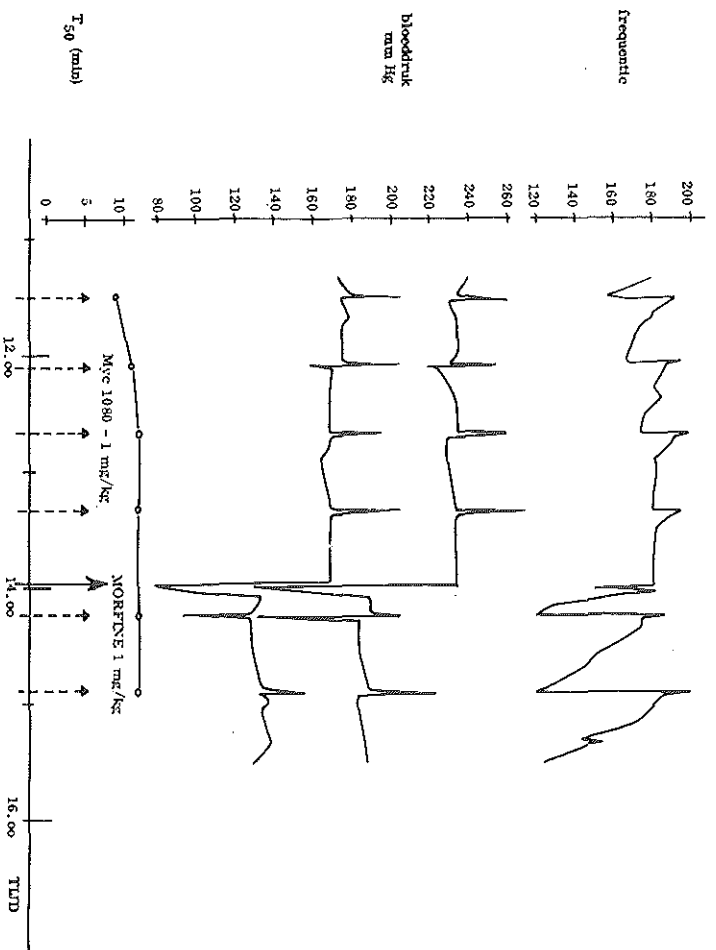


Fig. 65 - Interactive morphine - Myc 1080. Hond ♂ 10.7 kg.

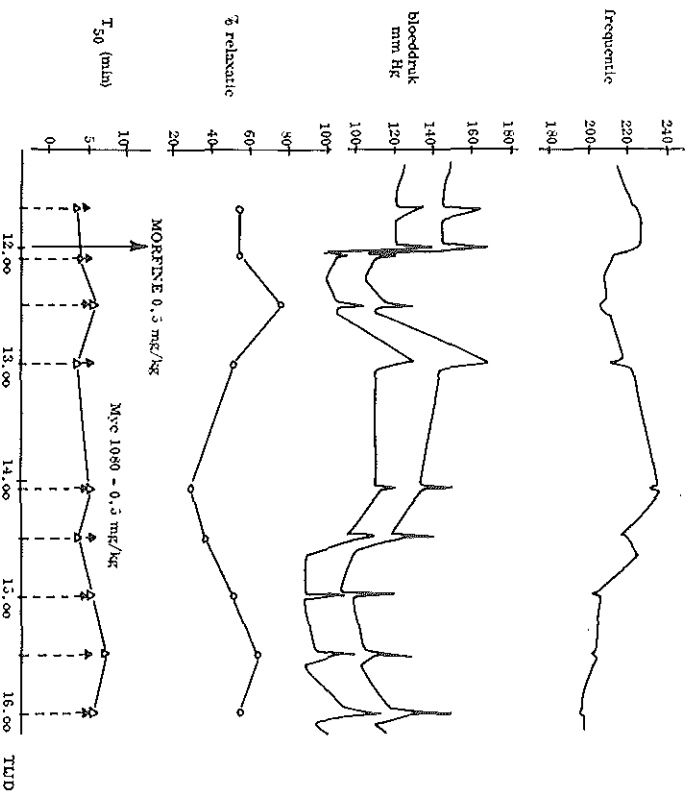


Fig. 66 - Interactive morphine - Myc 1080. Kat ♂ 3.2 kg.

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

Tachycardiën werden niet gezien (fig. 66). Wel een bloeddrukdaling door 0,5 mg/kg morfine, waarop gesuperponeerd zeer kortdurende tensiestijgingen (2-3 minuten), veroorzaakt door de injectie van 0,5 mg/kg Myc 1080. De extinctie werd duidelijk groter na morfine. Merkwaardigerwijze daalde deze in de loop van 1½ uur tot onder het uitgangsniveau om daarna weer ongeveer tot de norm terug te keren. Met de initiële stijging van de extinctie ging wel een geringe verlenging van de T_{50} gepaard, maar met de langzame daling deed de T_{50} niet mee. Extinctie en frequentie veranderden in tegengestelde zin.

2. In vitro

Twintig mg morfine toegevoegd aan het orgaanbad, veroorzaakte een reductie van de contractiehoogte en versterkte het effect van 0,4 mg Myc 1080 (fig. 67). Niet in deze figuur afgebeeld is de interactie van 0,5 mg Myc 1080 met lagere doseringen morfine, waaruit bleek, dat morfine reeds de Myc 1080-werking versterkt vanaf 1 mg.

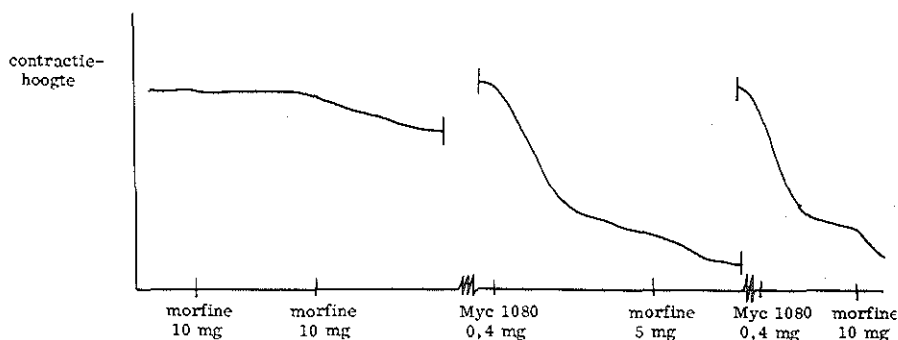


Fig. 67 - Interactie morfine - Myc 1080. N. phrenicus-diafragma in vitro.

3. Discussie

Frederickson en Pinsky (1,2) hebben bewezen, dat morfine de acetylcholine-afgifte in de neuromusculaire overdracht remt. Dit was reeds bekend voor centrale cholinergische en voor perifere muscarine-overdrachtstructuren.

De invloed van morfine op de T_{50} van Myc 1080 is evenwel afwezig bij de hond (van beide stoffen 1 mg/kg) en zwak bij de kat (van beide stoffen 0,5 mg/kg). In vitro is echter wel een effect te zien op de neuromusculaire overdracht: morfine allèen remt de spiercontracties boven 20 mg in het orgaanbad, maar versterkt reeds zichtbaar de werking van 0,5 mg Myc 1080 in een dosis van 1 mg. De verklaring is niet ver te zoeken. Een partiëel verlamd diafragma beschikt niet meer over de "safety factor" (Hoofdstuk II): elke vermindering van acetylcholine-afgifte komt tot uiting in verdere afneming van de spiercontractie. Een geheel onbeïnvloede neuromusculaire transmissie beschikt nog wèl over de "safety factor". Er is dus veel meer morfine nodig om een afneming van de spiercontracties te bewerkstelligen.

Wij hebben niet de door Frederickson en Pinsky gesignaleerde, onder invloed van morfine primair optredende, versterking van de contracties gezien. Deze zou berusten op een cholinesteraseremming door morfine.

(1) Frederickson, R.C.A. & Pinsky, C., Nature 231 (1971), 93.

(2) Frederickson, R.C.A. & Pinsky, C., Nature 231 (1971), 94.

Dat de effecten van morfine op de extinctie en T_{50} van Myc 1080 in vivo zo gering zijn, is waarschijnlijk te wijten aan de betrekkelijk lage dosis morfine. De hoogst gebruikte dosis was 1 mg/kg; een beginnend effect in vitro werd gezien met 1 mg in het orgaanbad van 75 ml.

De tachycardiën bij de hond door Myc 1080 zijn vanaf het door morfine verlaagde basale niveau meer geprononceerd.

MEPERIDINE

In een enkel proefje werd gevonden, dat ook meperidine in vitro een eigen eindplaatblokkerende werking bezit en wel vanaf 1 mg, terwijl er met 0,5 mg Myc 1080 een synergisme werd gevonden vanaf 0,2 mg.

Bij de hond werd een geringe stijging van de T_{50} waargenomen (Myc 1080 1 mg/kg; meperidine 2 mg/kg).

Behalve de tensiedaling en de kortdurende frequentiestijging tengevolge van de toediening van meperidine werden op deze parameters geen effecten van betekenis gezien.

CHLORPROMAZINE

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Chlorpromazine 6 mg/kg verlengt de T_{50} van Myc 1080 1 mg/kg van 14 tot 19 minuten en heeft tevens een interessant effect op de hartfrequentie (fig. 68).

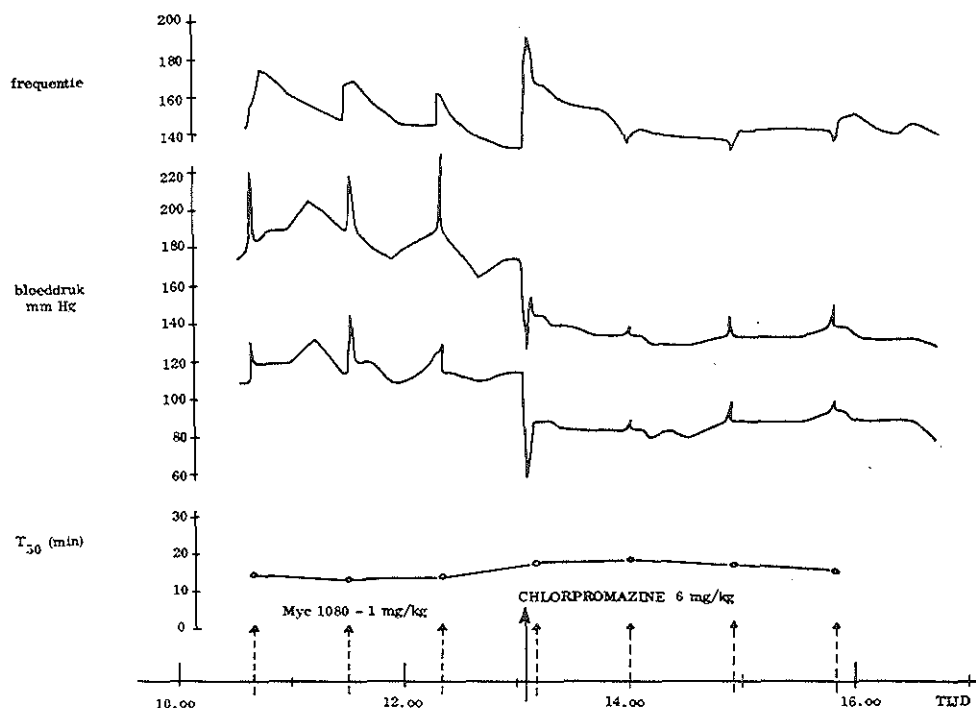


Fig. 68 - Interactie chlorpromazine - Myc 1080. Hond ♂ 8,4 kg.

De niet verwaarloosbare frequentiestijgingen door Myc 1080 alleen verdwijnen geheel na de chlorpromazine-toediening evenals de onregelmatigheden in de bloeddruk.

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

Uit fig. 69 blijkt, dat na toediening van 6 mg/kg chlorpromazine de extinctie door 0,25 mg/kg Myc 1080 steeg van 85 tot 99%. Dit ging gepaard met een geringe verlenging van de T₅₀. Effecten op de hartfrequentie werden nauwelijks gezien; wel werden de kortdurende tensiestijgingen door Myc 1080 na toediening van 6 mg/kg chlorpromazine langduriger.

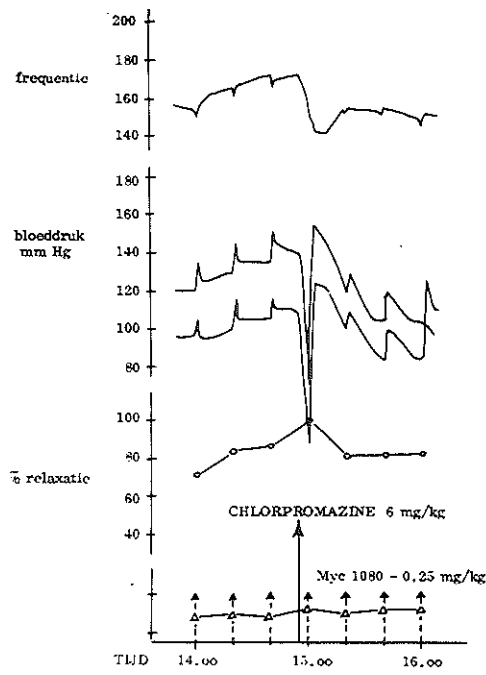


Fig. 69 - Interactie chlorpromazine - Myc 1080.
Kat 2.2 kg.

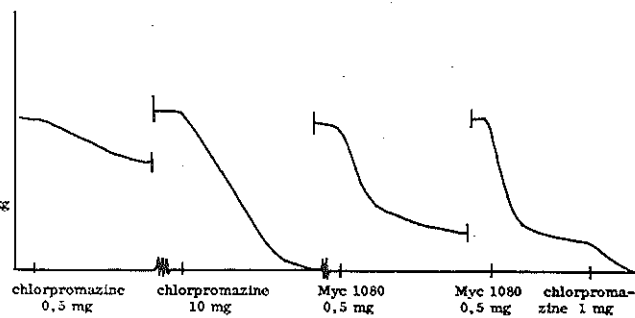


Fig. 70 - Interactie chlorpromazine - Myc 1080
N.phrenicus - diafragma in vitro.

2. In vitro

Chlorpromazine (0,5 en 1 mg) alleen reduceerde de contracties van het diafragma en versterkte de werking van 0,5 mg Myc 1080 (fig. 70).

3. Discussie

Bij de hond daalt met 6 mg/kg chlorpromazine wel de tensie, maar niet de hartfrequentie. Bij de kat daalt ook de frequentie. Ganglionblokkade en α -sympatholyse en mogelijk ook parasymphatholyse liggen ten grondslag aan deze verschijnselen (1,2,3,4).

Als incidentele bevinding bij de hond is te vermelden, dat 1 mg/kg Myc 1080 een matige frequentiestijging geeft, die door chlorpromazine volledig wordt voorkomen.

De verlenging door chlorpromazine van de T₅₀ bij hond en kat ziet men, zoals gezegd, ook

- (1) Kopera, J. & Armitage, A.K., Brit.J.Pharmacol., 9 (1954), 392.
- (2) Courvoisier, S., Fournel, J., Ducrot, R., Kolsky, M. & Koetschet, P., Arch.Int.Pharmacodyn.Ther., 92 (1953), 305.
- (3) Gordon, M., Psychopharmacological Agents (1967), in: Medicinal Chemistry, 4.
- (4) Burn, J.H., Proc.Roy.Soc.Med., 47 (1954), 617.

met gallamine en d-tubocurarine; zij beantwoordt geheel aan de verwachting. De eigen relaxerende werking in de Bülbring-opstelling wordt door Burn eveneens gemeld (1). Volgens Burn verlengt 1,3 mg/kg de werking van d-tubocurarine bij indirecte prikkeling van de M. gastrocnemius bij de gedecerebreerde kat; 3 mg/kg reduceert ook de directe prikkelbaarheid langzaam tot nul.

PROMETHAZINE

Zowel in vivo als in vitro werden met deze stof dezelfde interacties waargenomen als met chlorpromazine.

DIAZEPAM

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Fig. 71 geeft een overzicht van de interactie van Myc 1080 1 en 5 mg/kg met diazepam 2 mg/kg.

In de gebruikte dosering had diazepam geen invloed op de T_{50} van Myc 1080. Bloeddruk en hartfrequentie werden door Myc 1080 1 mg/kg niet beïnvloed. De hogere dosis van 5 mg/kg gaf kortdurende sterke dalingen te zien, evenals diazepam 2 mg/kg.

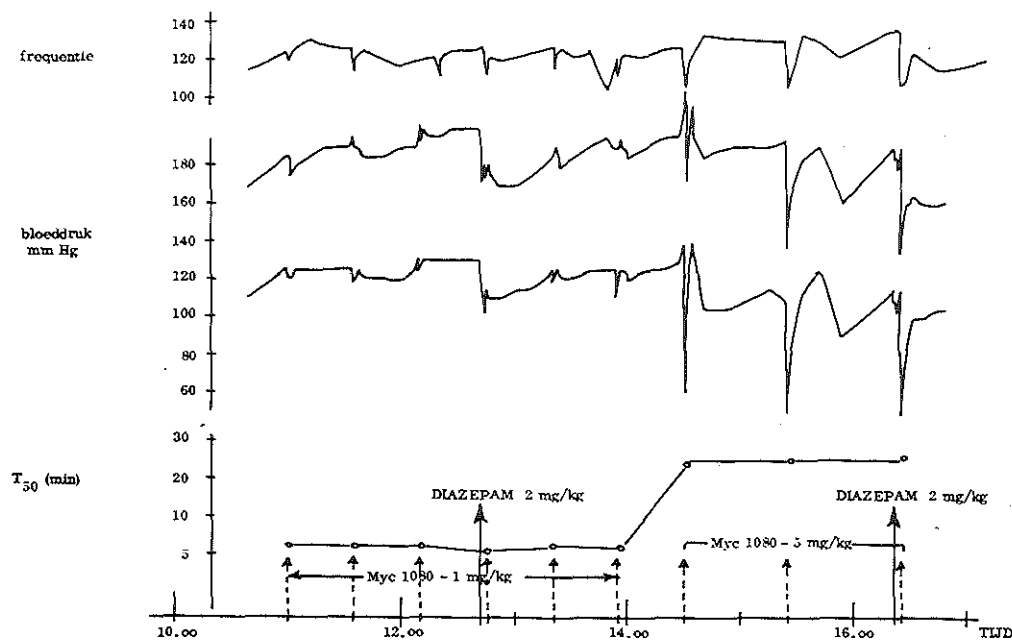


Fig. 71 - Interactie diazepam - Myc 1080. Hond ♂ 10,0 kg.

(1) Burn, J.H., Proc. Roy. Soc. Med., 47 (1954), 617.

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

De T_{50} van 0,5 mg/kg Myc 1080 werd niet beïnvloed door 2 mg/kg diazepam. Na injectie van 4 mg/kg diazepam namen de relaxatie en in geringere mate ook de T_{50} toe (fig. 72).

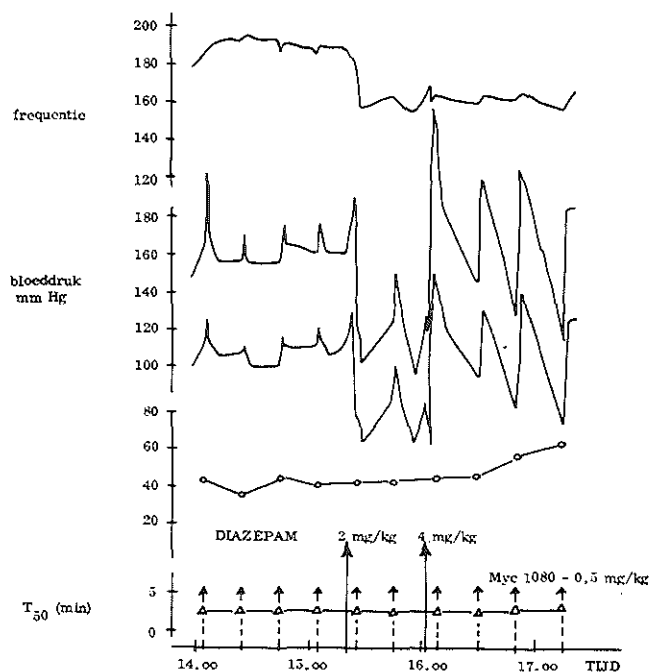


Fig. 72 - Interactie diazepam - Myc 1080. Kat φ 2,2 kg.

Bloeddruk en hartfrequentie dalen sterk door 2 mg/kg diazepam, maar zij dalen niet verder na 4 mg/kg, integendeel, de bloeddruk stijgt tijdelijk zeer scherp om snel weer terug te zakken.

Myc 1080 0,5 mg/kg, dat deze parameters zonder diazepam vrijwel niet beïnvloedt, onderbreekt deze daling telkens door kortdurende stijgingen zonder de frequentie te beïnvloeden.

2. In vitro

Diazepam 2 mg, toegevoegd aan het bad, reduceert de contractiehoogte met 18%; 4 mg geeft zelfs totale uitdoving.

Het versterkt de werking van Myc 1080 0,4 mg (fig. 73).

3. Discussie

Dat diazepam een perifere werking bezit op de neuromusculaire overdracht, blijkt duidelijk uit de proef in vitro. Niet alleen bezit het een eigen relaxerende werking, maar het versterkt bovendien de werking van Myc 1080. Dit wordt in vivo inderdaad ook waargenomen bij hoge doses diazepam (4 mg/kg). Deze dosis potentiëert volgens Cheymol et al. (1) ook de werking van d-tubocurarine en gallamine bij konijnen.

Potentiëring van de werking van d-tubocurarine werd eveneens bij het konijn ("head drop")

(1) Cheymol, J., Van den Driessche, J., Allain, P. & Eben Moussi, E., *Anesth. Analg. Reanim.*, 24 (1967), 329.

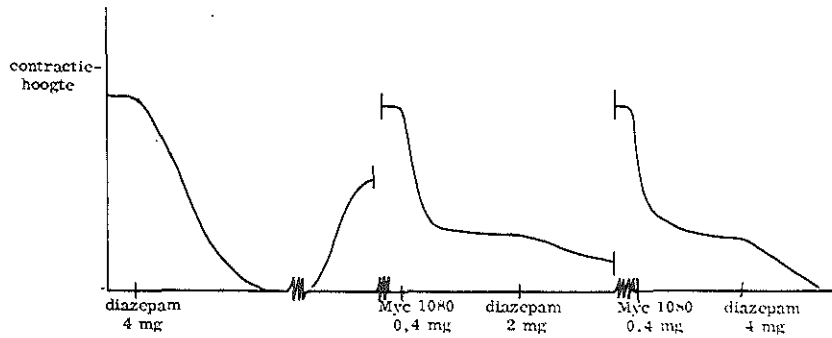


Fig. 73 - Interactie diazepam - Myc 1080. N. phrenicus-diafragma in vitro.

vastgesteld door Sansone et al. (1) na 3 dagen voorbehandeling met 0,8 en 1,6 mg/kg diazepam i.v.

De interactie van Myc 1080 met diazepam lijkt dus hetzelfde beeld te vertonen als dat van diazepam met gallamine of d-tubocurarine.

CHLORDIAZEPOXIDE

Met deze stof werd ongeveer hetzelfde gevonden als met diazepam. Op gewichtsbasis waren de effecten over het algemeen iets geringer.

HEXAMETHONIUMCHLORIDE

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Myc 1080 5 mg/kg veroorzaakt een langdurige frequentiestijging en een kortdurende stijging van de systolische en in mindere mate van de diastolische bloeddruk (fig. 74). Na 5 mg/kg hexamethonium - dat zelf een daling van frequentie en tensie veroorzaakt - is de invloed van Myc 1080 op de frequentie geheel verdwenen en op de (verlaagde) systolische en diastolische bloeddruk versterkt.

De T_{50} stijgt enigszins (van 25 tot 30 minuten).

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

De gebruikte lage dosering (0,5 mg/kg) Myc 1080 veroorzaakt een zeer geringe frequentiestijging (fig. 75).

Na 4 mg/kg hexamethonium, dat zelf een frequentie- en tensiedaling veroorzaakt, is deze invloed geheel verdwenen. Naarmate hexamethonium uitgewerkt raakt, keert de frequentie naar een hoger niveau terug, evenals de bloeddruk.

De invloed van Myc 1080 op de bloeddruk vóór en na de toediening van hexamethonium verschilt nauwelijks. De relaxatie wordt duidelijk groter na toediening van de ganglion-blokkeerder. De T_{50} wordt niet zichtbaar beïnvloed.

(1) Sansone, M., Aulisio, G.A. & Marino, A., *Boll.Soc.Ital.Biol.Sper.*, **43** (1967), 236.

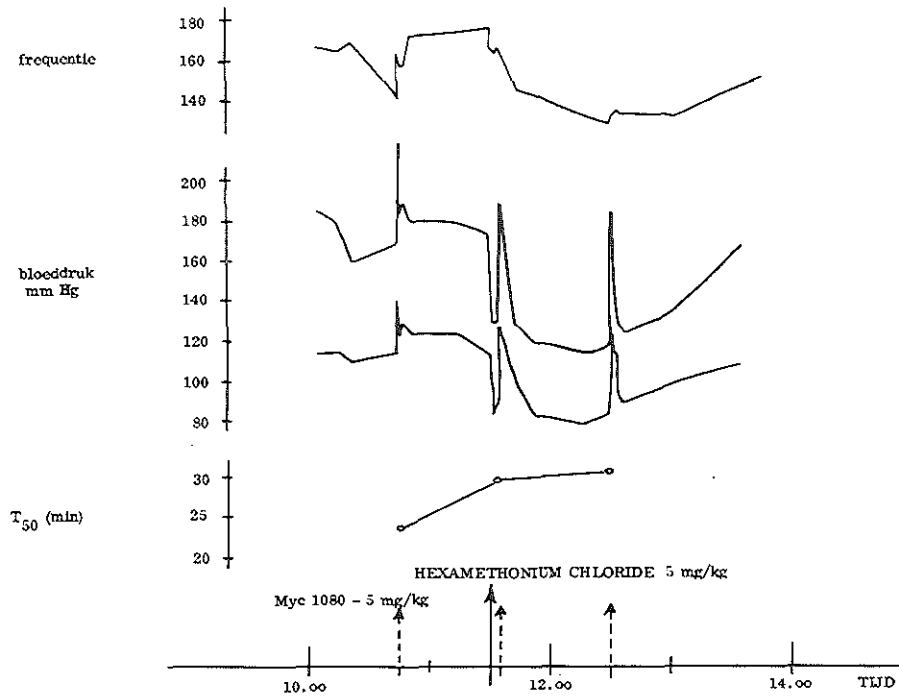


Fig. 74 - Interactie hexamethonium chloride - Myc 1080. Hond ♀ 7,5 kg.

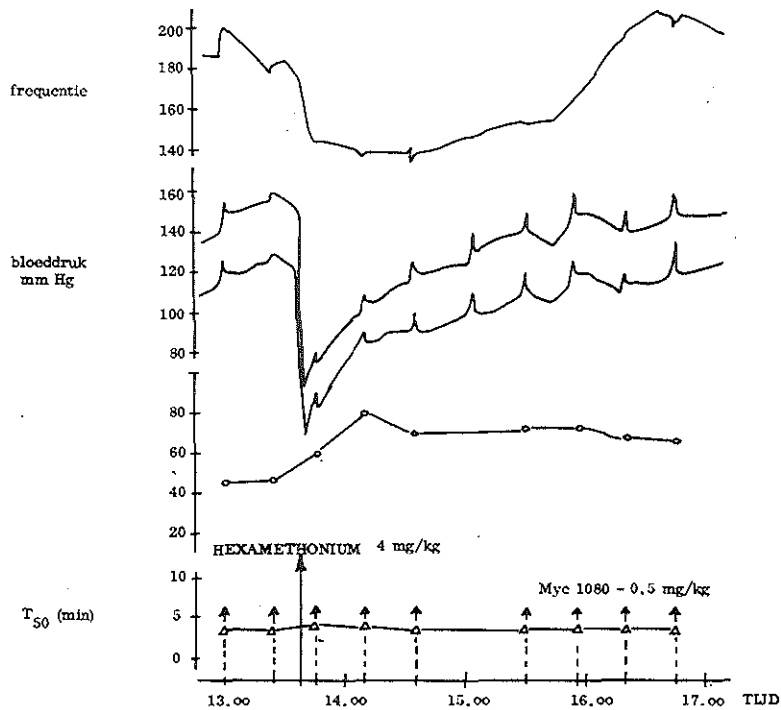


Fig. 75 - Interactie hexamethonium- Myc 1080. Kat ♂ 3,8 kg.

2. In vitro

Hexamethonium alleen geeft een dosisafhankelijke afneming van de contractiehoogte: 2 en 4 mg hebben geen effect; 10 mg reduceert de contractie slechts met 20% en 20 mg met 70%. Toediening van hexamethonium na 0,5 mg Myc 1080, dat zelf de contractie reduceert tot 40%, geeft een verdere daling van de contractiehoogte, echter niet additief: 4 mg geeft een verdere daling van 10%, 10 mg van 17% en 15 mg van 21% (fig. 76).

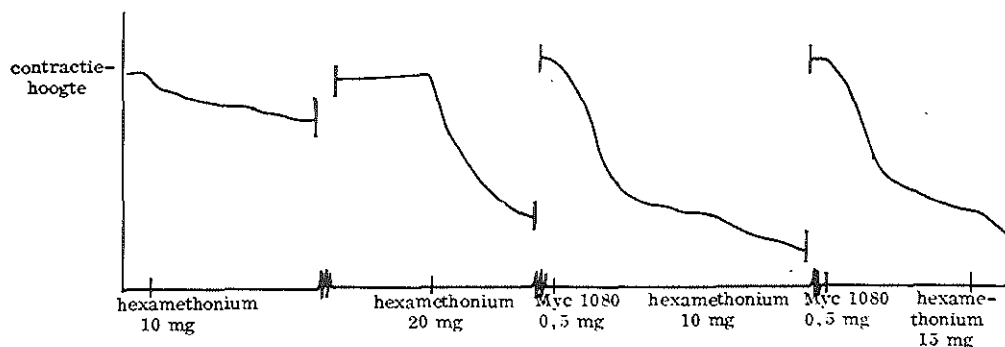


Fig. 76 - Interactie hexamethonium - Myc 1080. N. phrenicus-diafragma in vitro.

3. Discussie

Bij de hond stijgt de T_{50} enigszins (interactie van 5 mg/kg Myc 1080 met 5 mg/kg hexamethonium); bij de kat stijgt de T_{50} niet merkbaar; wel neemt de relaxatie toe van ongeveer 45% tot ongeveer 75% (interactie van 0,5 mg/kg Myc 1080 met 4 mg/kg hexamethonium). Blijkbaar is de invloed van hexamethonium op de redistributiesnelheid van Myc 1080 gering. Dat de werking van beide stoffen in vitro subadditief is, zou erop kunnen wijzen, dat hexamethonium niet zo goed past op de receptor in de eindplaat als Myc 1080 en dus grotendeels door Myc 1080 wordt verdreven.

Analoge proeven hebben wij in de literatuur niet gevonden.

STREPTOMYCINE

1. In vivo

1.1. Met supramaximale doseringen van Myc 1080 bij de hond

Streptomycine 100 mg/kg doet de bloeddruk en de hartfrequentie dalen en verlengt de T_{50} van 1 mg/kg Myc 1080 van 10 tot 18 minuten (fig. 77). Er zijn tussen de twee stoffen geen interacties van betekenis waarneembaar op bloeddruk of hartfrequentie. Streptomycinesulfaat 10 mg/kg is onwerkzaam.

1.2. Met submaximale doseringen van Myc 1080 bij de kat

De resultaten (fig. 78) zijn kwalitatief gelijk aan die verkregen bij de hond (1.1.). Omdat hier submaximale doseringen van Myc 1080 zijn gebruikt, ziet men dat ook de relaxatie door Myc 1080 na toediening van 25 mg/kg streptomycinesulfaat sterk toeneemt (van 52% naar 100%).

Ook hier valt weer op, dat de frequentie met de betrekkelijk lage dosis van 0,4 mg/kg Myc 1080 telkens met ongeveer 20 slagen per minuut stijgt. Daarentegen is van een frequentie-beïnvloeding met de hogere dosis van 1 mg/kg bij de hond in de vorige proef niets te bespeuren.

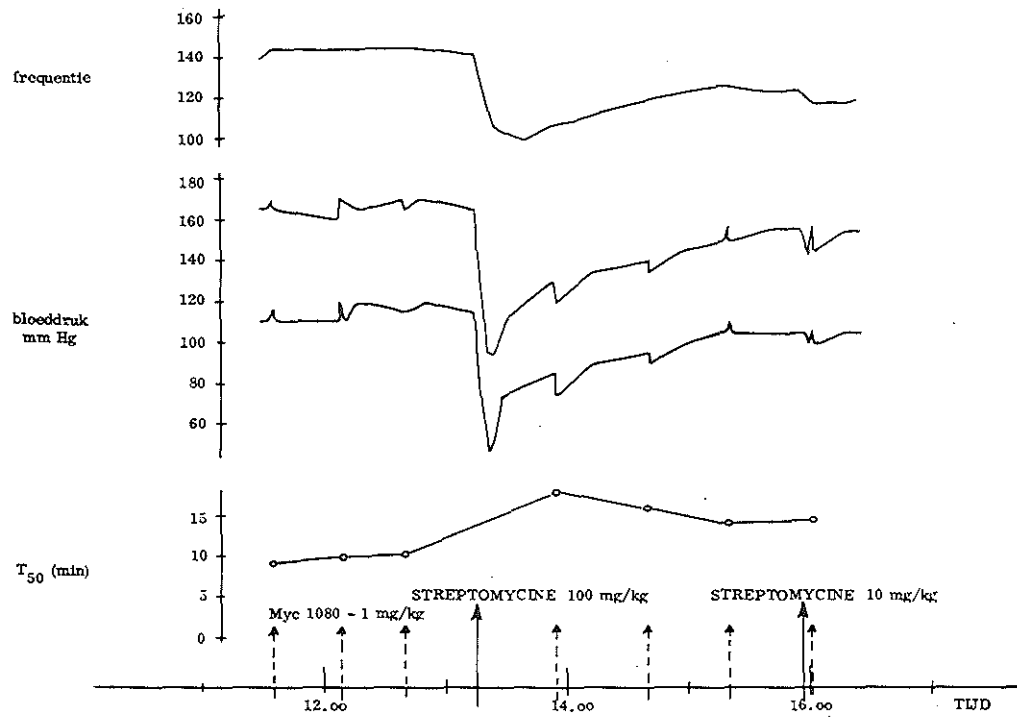


Fig. 77 - Interactie streptomycine - Myc 1080. Hond ♂ 31 kg.

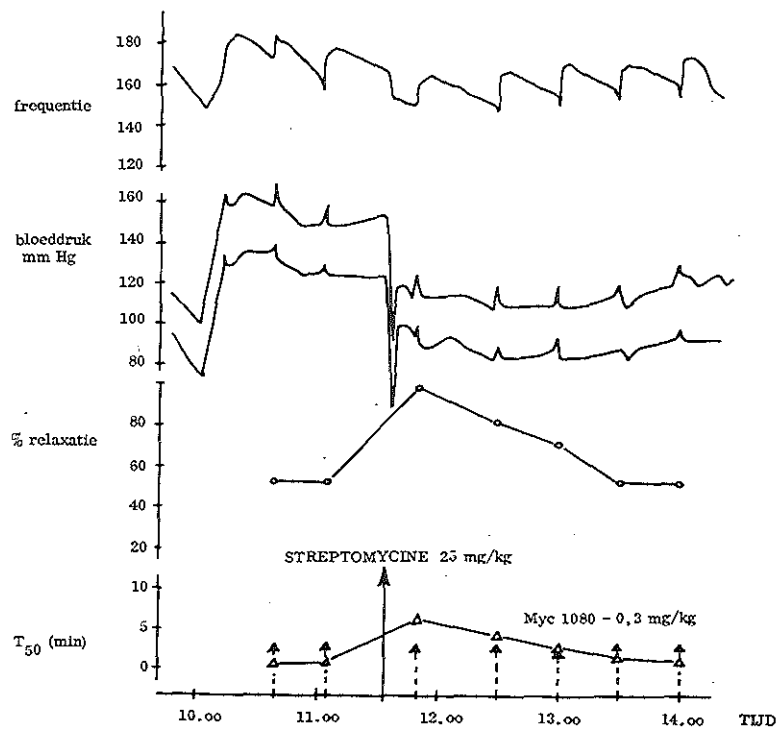


Fig. 78 - Interactie streptomycine - Myc 1080. Kat ♂ 3,4 kg.

2. In vitro

Ook in vitro heeft streptomycinesulfaat een eigen relaxerende werking. Het versterkt de werking van Myc 1080 0,2 mg (fig. 79).

De toename van de verlamming is groter dan verwacht werd uit de eigen werking van deze dosering. Er is dus sprake van potentiëring.

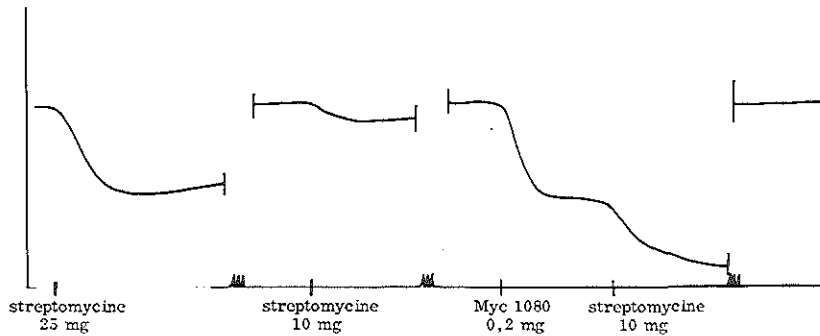


Fig. 79 - Interactie streptomycine - Myc 1080. N. phrenicus-diafragma in vitro.

3. Discussie

De bevindingen met de combinatie Myc 1080 - streptomycinesulfaat zijn geheel in overeenstemming met de resultaten van de combinatie streptomycine - d-tubocurarine bij konijnen, beschreven door Timmerman et al. (1) en Bezzi en Gessa (2). Zij vermelden ook een potentiërend effect tussen de twee stoffen: Timmerman et al. vonden met het ischiadicus-gastrocnemius-preparaat, dat 40 µg d-tubocurarinechloride een relaxatie geeft van 23%, 25 mg streptomycinesulfaat van 10% en de combinatie van 92%; Bezzi en Gessa vonden, dat een zwak werkzame dosis van 50 mg/kg streptomycine bij niet geanestheerde konijnen veel sterker werkt wanneer deze dosis gegeven wordt aan dieren, die juist hersteld zijn van een partiële verlamming door d-tubocurarinechloride.

Steinbereithner (3) en Blanc (4) geven een literatuuroverzicht over de synergistische werking van antibiotica met spierrelaxantia van het curare-achtige type. Daarin wordt vermeld, dat de bloeddrukdalende werking van streptomycine berust op een ganglionblokkering. Het type van de blokkering vertoont veel overeenstemming met het Mg^{++} -block. Dit blijkt vooral uit de promptte antagonistische invloed van Ca^{++} -ionen op het streptomycine-block en de partiële antagoniseerbaarheid ervan door cholinesteraseremmers.

4. Samenvatting

Uit klinische waarnemingen is bekend, dat de werking van spierrelaxantia kan worden beïnvloed door interactie met andere bij de anesthesie in gebruik zijnde stoffen. Ten behoeve van de anesthesist die de eerste proeven bij patienten moest uitvoeren, werd daarom bij hond en kat en in vitro met het N-phrenicus-diafragma-preparaat van de rat een aantal oriënterende interactieproeven ondernomen van Myc 1080 met de volgende stoffen: succinylcholine, atropine, ether, lachgas, halothaan, morfine, meperidine, chlorpromazine, promethazine, diazepam, chlordi-azepoxide, hexamethonium en streptomycine.

(1) Timmerman, J.C., Long, J.P. & Pittinger, C.B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1 (1959), 299.

(2) Bezzi, G. & Gessa, G.L., *Antibiot. Chemother.*, 9 (1961), 710.

(3) Steinbereithner, K., *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.*, 23 (1967), 57.

(4) Blanc, A., *Anesth. Analg. Reanim.*, 23 (1966), 909.

De resultaten werden vergeleken met literatuurgegevens (voor zover aanwezig en vergelijkbaar) van andere eindplaatremmers van hetzelfde type. Hieruit kan worden afgeleid, dat relaxatie en werkingsduur van Myc 1080 in dezelfde zin werden beïnvloed als bekend is van andere relaxantia, zoals d-tubocurarine en gallamine. Interactiefenomenen op bloeddruk en hartfrequentie bij proefdieren zijn in de literatuur schaars, zodat vergelijking niet goed mogelijk is. Verschillen met relaxantia van hetzelfde type als Myc 1080 werden niet gevonden, wel enkele overeenkomsten.

SAMENVATTING EN CONCLUSIE

In deze monografie wordt verslag gedaan van het farmacologisch onderzoek van een potentieel nieuw perifeer werkend spierrelaxans.

In Hoofdstuk I worden de eisen besproken, waaraan zo'n verbinding moet voldoen om bij gebruik in de anesthesie een reële verbetering te betekenen. Gesteld wordt, dat de stof ten minste even snel en compleet moet inwerken als succinylcholine om te kunnen worden gebruikt bij de intubatie van de mens aan het begin van een operatie. De stof dient verder nog een korte werkingsduur te bezitten, die door bijsputten verlengd kan worden tot de duur van de operatie. Hiermee zou dan kunnen worden afgezien van de gangbare praktijk, waarin men intubeert met behulp van het depolariserende succinylcholine en de spierrelaxatie verder regelt met d-tubocurarine, of een andere competitief werkende niet-depolariserende verbinding. Het zou niet alleen de procedure vereenvoudigen, maar ook het ongewenste antagonisme, dat tussen deze twee typen verbindingen in het eindplaatgebied bestaat, elimineren.

Uiteraard dient de werking antagoneerbaar te zijn met een specifieke antagonist, terwijl zo mogelijk alle nadelen van de meest gebruikte andere spierrelaxantia afwezig moeten zijn, zoals histaminevrijmaking, ganglionblokkering in therapeutische doseringen, tachycardieën, bloeddrukdalingen, excessieve salivatie en bronchiaalsecretie. Verder is het gewenst, dat de stof zeer moeilijk of in het geheel niet de placentabarrière passeert, teneinde de toepassing bij sectio caesarea mogelijk te maken en de kans op teratogene werkingen te verminderen.

Nadat in Hoofdstuk II een algemeen overzicht is gegeven van de neuromusculaire overdracht, waarbij voornamelijk aandacht is besteed aan de begrippen, die in de volgende hoofdstukken ter sprake komen, worden in Hoofdstuk III de verschillende werkingstypen van de bestaande spierrelaxantia besproken. Voor de nieuw te ontwikkelen stof wordt gekozen voor het type dat werkt op basis van een competitief antagonisme tegen acetylcholine ter plaatse van de acetylcholinereceptor.

Het was reeds bekend, dat conessine gewonnen uit de bast van *Holarrhena antidysenterica*, een struik in India en Centraal Afrika, in hoge doseringen een spierverslappende werking bezit. De structuurformule wordt gegeven in Hoofdstuk IV. Het bezit van twee N-atomen in deze steroid-structuur op ongeveer gelijke afstand als in d-tubocurarine maakte het waarschijnlijk, dat mono- of biskwaternisering van de stof potente spierrelaxantia zou kunnen opleveren. In hetzelfde hoofdstuk wordt het resultaat gegeven van een onderzoek in de tijdschrift- en octrooiliteratuur naar andere stikstofhoudende steroiden met spierrelaxerende eigenschappen.

Tenslotte wordt de chemische structuur beschreven van 20 nieuw gesynthetiseerde conessine-derivaten, die in een primaire screening onderzocht zijn op hun spierrelaxerende eigenschappen. De stoffen werden gecodeerd met een Myc-nummer.

De genoemde primaire screening komt uitvoerig ter sprake in Hoofdstuk V. Gebruik werd gemaakt van het N-peroneus-M. tibialis-preparaat van kat en hond in vivo. Er werd gewerkt met enkelvoudige, supramaximale, rechthoekige prikkels met een duur van 0,4 msec en een frequentie van 4 per minuut. Naast de op het ontdekken van ongewenste bijwerkingen gerichte registratie van bloeddruk, hartfrequentie en ECG, werden als parameters gehanteerd de latente tijd (TL₉₀), gedefinieerd als het tijdsverloop tussen het moment van i.v. spuiten van een dosis, die 90% relaxatie teweeg brengt (RD₉₀) en het moment waarop juist een maximale relaxatie is bereikt; voorts de T₅₀, d.i. het tijdsverloop tussen het moment van injectie en het moment, waarop 50% van het maximaal bereikte effect weer is verdwenen.

Dit is uiteraard mede afhankelijk van de toegepaste dosering. Daarom werden dosis- T_{50} -relaties vastgesteld. Tenslotte werd een onderzoek ingesteld naar het verband TL_{90} - T_{50} , waarbij werd verondersteld, dat een stof met korte TL_{90} en een korte T_{50} evenals succinylcholine kans zou maken bruikbaar te zijn bij intubatie in de kliniek.

Als selectiecriteria werden gehanteerd:

1. korte latente tijd (TL_{90}).
2. kleine T_{50} tot zo hoog mogelijke, ook supramaximale doseringen.
3. afwezige of onbetekenende veranderingen in bloeddruk, hartfrequentie en ECG in een zo groot mogelijk dosisgebied.
4. antagonistische met specifieke antagonisten, i. c. acetylcholinesteraseremmers.

Nadat deze parameters in de beschreven proefopstellingen waren bepaald voor de referentiestoffen alcuronium, gallamine, d-tubocurarine, pancuronium en succinylcholine, werden de Myc-stoffen op dezelfde wijze onderzocht.

Evenals voor de referentiestoffen bleek er voor de Myc-stoffen zowel bij honden als bij katten een positieve correlatie te bestaan tussen de duur van de TL_{90} en de duur van de T_{50} . Uit de groep van de kortstwerkende verbindingen met een over een groot dosisbereik vlakke dosis/ T_{50} -curve, zowel bij de hond als bij de kat, werd Myc 1080 uitgekozen op grond van zijn hemodynamisch gunstige eigenschappen: bloeddruk- en frequentieafwijkingen van betekenis werden pas gezien boven doseringen van $5 \times RD_{90}$.

In Hoofdstuk VI wordt een overzicht gegeven van de onderzoeken nodig voor verdere evaluatie van Myc 1080. Deze worden in Hoofdstuk VII nader uitgewerkt. Allereerst werden de in de primaire screening gevonden waarden in verscheidene proeven nauwkeuriger vastgesteld. De RD_{90} bij hond en kat bleken ongeveer gelijk, resp. 0,42 en 0,46 mg/kg; de bijbehorende T_{50} bedraagt 6 minuten en de TL_{90} 1,25 - 1,5 minuut. Bij supramaximale doseringen is 100% relaxatie reeds bereikt binnen 30 seconden. Bij ongeveer $3 \times RD_{90}$ wordt een T_{50} verkregen van 15 minuten. De stof is dus kortwerkend en kan zich, ook in het supramaximale dosisgebied, meten met succinylcholine. Dit geeft hoop, maar geen zekerheid, dat de stof zowel voor intubatie als voor voortgezette relaxatie bij de mens bruikbaar zal zijn. Uit de primaire screening was reeds het vermoeden gerezen, dat de stof behoort tot de groep van de competitief werkende niet-depolariserende eindplaatremmers.

Stoffen die tot dit type eindplaatremmers behoren, onderscheiden zich van andere bekende typen door de volgende experimentele kenmerken: ze veroorzaken een slappe verlamming zonder fasciculaties bij zoogdier-, kikker- en vogelspijeren, die te antagoniseren is door acetylcholinesteraseremmers en door depolariserende stoffen zoals succinylcholine. Het tijdsverloop tussen het moment van injectie en het inzetten van de verlamming is kort, terwijl de cholinesteraseremmende werking zwak is.

Zowel in vivo (N. peroneus-M. tibialis kat en hond) als in vitro (M. semispinalis kuiken, M. rectus abdominis kikker) blijkt de stof zich geheel te gedragen volgens de kenmerken van dit type.

De acetylcholinesteraseremmende werking werd in vitro (humane erythrocyten) gemeten met de methode volgens Jensen-Holm. Myc 1080 bleek ongeveer 550 maal zo zwak te zijn als neostigmine en $8 \times$ zo sterk als d-tubocurarine. Berekening leerde, dat de cholinesteraseremmende werking merkbaar begint te worden bij 3 mg/kg, d. i. $6 \times RD_{90}$. Hieruit volgt, dat de remming van de neuromusculaire overdracht niet primair veroorzaakt wordt door de acetylcholinesteraseremmende werking van Myc 1080, hetgeen in overeenstemming is met de andere genoemde bevindingen. Er zijn aanwijzingen, dat in vivo de marge tussen ganglionblokkerende en acetylcholinesteraseremmende, dus ganglionstimulerende, werking klein is, zodat bij hogere doseringen zeker met een dualistische werking op het ganglion gerekend moet worden.

In Hoofdstuk VIII wordt een onderzoek verricht naar een aantal bijwerkingen. Noch met de methode volgens Konzett Rössler bij de cavia tot 20 mg/kg i. v., noch na intracutane injecties bij de mens 10 μ g, kon histaminevrijmaking worden aangetoond. Met de i. p. toe-

diening aan ratten van 100 mg/kg volgens de methode van Fawcett werd wel een geringe hoeveelheid histamine gevonden, afkomstig uit de mastcellen in het peritoneum, maar de activiteitsverhouding t.o.v. d-tubocurarine in dit opzicht was ongeveer 1:100. Als model voor de ganglionblokkerende werking in vitro werd gebruikt de M. rectus abdominis van de kikker, met als agonist nicotine; voor de eindplaatremmende werking de M. rectus abdominis van de kikker met als agonist succinylcholine. Op deze wijze werd een verhouding tussen de beide werkingen gevonden van 1,74. In vivo werd met preganglionaire prikkeling van de membrana nictitans en indirecte prikkeling van de M. tibialis bij de kat een verhouding van ongeveer 5 gevonden. Dit laatste komt overeen met de verhouding tussen de dosis, waarbij juist hemodynamische effecten van betekenis beginnen op te treden, en de RD₉₀. Onderzoek naar de verhoging van speeksel- en bronchiaalsecreties werd niet verricht, omdat uit proeven in vitro met de rattedarm was gebleken, dat de anti-muscarine-werking van Myc 1080 ongeveer bij dezelfde dosis begint op te treden als de eindplaatremmende werking. Er mag in supramaximale doseringen dus een verlaging van deze secreties worden verwacht. De kans op cumulatie is klein, omdat geen stijging werd gevonden van de T₅₀ bij vele malen herhaalde toediening van de RD₉₀ (= 0,5 mg/kg) bij de hond met een interval van 15 minuten. Myc 1080 bleek niet of nauwelijks de placenta te passeren, zoals sectio caesarea na 5 mg/kg aan rat en hond leerde. De jongen kwamen alle goed ademend en bewegend ter wereld.

De resultaten van toxicologische onderzoeken staan uitvoerig beschreven in Hoofdstuk IX.

De moeilijkheid bij het uitvoeren van toxiciteitsonderzoeken met spierrelaxantia is, dat men tijdens de toediening kunstmatig moet beademen onder een lichte algemene anesthesie. Dit maakt de interpretatie van eventueel gevonden afwijkingen moeilijk, zo niet onmogelijk. Daarom werd bij honden volstaan met een eenmalige dosering van 2,5 - 5 en 10 mg/kg. Bestudeerd werden hematologie, leverfuncties, urinesamenstelling en ECG vóór toediening en op verschillende tijdstippen erna. Na 6 weken werd autopsie verricht en werden de organen macroscopisch en microscopisch bekeken. Er werden geen andere afwijkingen gevonden dan siderose in de sterzellen van de lever. Dit gaf aanleiding hieraan een speciaal onderzoek te wijden, ook ten aanzien van een eventueel verminderde osmotische weerstand der erythrocyten in vitro en in vivo. Het was niet mogelijk de siderose te bevestigen. Ook bleek niets van een verlaging van de osmotische weerstand der erythrocyten.

Aan ratten werd Myc 1080 dagelijks toegediend gedurende 3 weken in doseringen van 3, 6 en 12 mg/kg onder kunstmatige beademing met de kinderrespirator van Keuskamp. Bestudeerd werden gewichtsverloop, hematologie, leverfuncties, samenstelling van de urine en vagina-uitstrijkjes; aan het eind van de proef werd macroscopisch en microscopisch onderzoek van de organen verricht; waarbij vooral werd gelet op gewicht en histologie van endocriene klieren en primaire en secundaire geslachtsorganen.

Behalve verminderde groei bij de mannetjes en zelfs gewichtsverlies bij de vrouwtjes, werden geen afwijkingen gevonden die een aanwijzing vormden voor een toxische invloed van de stof. In een hierop gericht onderzoek bleek, dat de invloed op het lichaamsgewicht kon worden teruggebracht tot verminderde eetlust, die weer samenhang met de halothaan-behandeling en kunstmatige ademhaling, terwijl een darmparalyse door de parasympholytische en ganglionblokkerende eigenschappen van de stof ook nog een rol speelde. Geen afwijkingen werden gevonden die erop zouden kunnen duiden, dat het steroïde Myc 1080 hormonoïde bijwerkingen bezit.

Omdat het mogelijk is dat bij bewaring van gereede ampullen ontledingsprodukten ontstaan, werd een acuut toxiciteitsonderzoek bij muizen en een 7 dagen durend subacuut toxiciteitsonderzoek bij honden verricht met grote doseringen van het door thermische bewerking volledig ontlede produkt. De dieren werden gedurende 6 weken geobserveerd; verder werden bloed en urine onderzocht. Aan het eind van de proef werd autopsie verricht met macroscopisch en microscopisch onderzoek. Er werden geen toxische afwijkingen gevonden. De LD₅₀ van het ontlede produkt bij muizen bedraagt 40 mg/kg. Dit is veel hoger dan die van intact Myc 1080 (1,5 mg/kg).

In Hoofdstuk X worden proeven beschreven over het lot in het organisme van met C^{14} gemerkt Myc 1080.

Het bloedspiegelverloop en de eliminatie via de ademhaling (meting $C^{14}O_2$), via urine en faeces werden bestudeerd bij ratten met en zonder afgebonden galgangen, met galfistel of afgebonden nierarteriën. Hieruit bleek het volgende excretiepatroon gemeten over 10 dagen:

uitademingslucht	0%
urine	25%
via gal in faeces	55%
diffusie naar maagdarmkanaal	10%
	<hr/>
	90%

De bloedspiegel vertoont een kortdurende piek, gevolgd door een langzame daling.

Er zijn geen duidelijke tekenen van omzetting van de stof gevonden. De stof verschijnt snel in urine en gal, maar toch kan de eliminatie niet de oorzaak zijn van de korte werkingsduur; serumbinding evenmin, omdat in een dialyse-experiment bleek, dat bij fysiologische pH slechts 2% van de stof zich bindt aan serumewitten.

Autoradiografische onderzoeken bij de rat leerden, dat Myc 1080 na i.v. injectie zich verdeelt over de extracellulaire ruimte met een duidelijke affiniteit tot bind- en steunweefsel. Daarna volgt een snelle redistributie, waarbij de stof zich ophoopt in lever en nier. Deze organen scheiden de stof geleidelijk uit, via de urine met een $T_{\frac{1}{2}} = 108$ en via de gal met een $T_{\frac{1}{2}} = 71$ uur. Deze redistributie verloopt zo snel, dat hiérmee de korte werkingsduur van Myc 1080 volledig kan worden verklaard.

Uit autoradiografische onderzoeken bij de zwangere rat op verschillende tijdstippen van de zwangerschap bleek, dat in een vroeg stadium der placentatie (7 dagen post coitum) Myc 1080 in de vrucht doordringt. Het was niet uit te maken, of de radioactiviteit was opgehoopt in de placenta, dan wel in het foetus, dan wel in beide. In latere stadia van de zwangerschap (13 en 20 dagen post coitum) vormt de placenta een vrijwel onoverkomelijke barrière voor de stof. Enkele proefjes met katten en honden gaven een eliminatiepatroon te zien, dat grote overeenstemming vertoonde met dat bij ratten.

Uit interactieproeven met het zure mucopolysaccharide heparine bleek, dat Myc 1080 een affiniteit bezit tot deze macromoleculen.

Daarom werd nagegaan, of de stof zich bindt in het motorische-eindplaatgebied, waarvan bekend is dat het rijk is aan zure mucopolysacchariden. Muizendiafragma's werden op verschillende tijdstippen na i.v. injectie van Myc 1080- C^{14} geïsoleerd volgens de methode van Waser en autoradiografisch onderzocht. De door Waser als receptoren aangeduide structuren werden inderdaad zichtbaar. Het viel op, dat de zwarting zeker niet afgenomen, eerder toegenomen was, nadat de stof op de *M. gastrocnemius* reeds was uitgewerkt. Dit pleit tegen de opvatting van Waser, dat de gevisualiseerde structuren receptoren voorstellen. Myc 1080 bindt zich waarschijnlijk snel aan de receptoren, maar ook aan de zure mucopolysacchariden in het eindplaatgebied. Als de stof reeds van de receptoren is verdwenen, blijft de radioactiviteit blijkbaar nog lange tijd gebonden aan secundaire structuren rondom de receptor.

Uit klinische waarnemingen is bekend, dat de werking van spierrelaxantia kan worden beïnvloed door interactie met andere bij de anesthesie in gebruik zijnde stoffen. Ten behoeve van de anesthesist die de eerste proeven bij patienten moest uitvoeren werd daarom bij hond en kat en in vitro met het N-phrenicus-diafragmapreparaat van de rat een aantal oriënterende interactieproeven ondernomen van Myc 1080 met de volgende stoffen: succinylcholine, atropine, ether, lachgas, halothaan, morfine, meperidine, chlorpromazine, promethazine, diazepam, chlordiazepoxide, hexamethonium en streptomycine (Hoofdstuk XI). De resultaten werden vergeleken met literatuurgegevens (voorzoover aanwezig en vergelijkbaar) van andere eindplaatremmers van hetzelfde werkingstype. Hieruit kon worden afgeleid, dat relaxatie en werkingsduur van Myc 1080 in

dezelfde zin werden beïnvloed als bekend is van andere relaxantia zoals d-tubocurarine en gallamine. Interactiefenomenen op bloeddruk en hartfrequentie bij proefdieren worden in de literatuur sporadisch vermeld, zodat vergelijking niet goed mogelijk was. Verschillen met relaxantia van hetzelfde type als Myc 1080 werden niet gevonden, wèl enkele overeenkomsten.

Geconcludeerd kan worden, dat Myc 1080 voldoet aan de in Hoofdstuk I gestelde eisen: snel inzettende werking, korte werkingsduur, antagoniseerbaarheid met acetylcholinesteraserepressoren, weinig neiging tot cumulatie, zodat de werkingsduur door bijspuiten goed regelbaar is, geen histamine-vrijmaking, geen invloed van betekenis op bloeddruk, hartfrequentie en ECG bij therapeutische doseringen, geen bevordering van bronchiaal- en speekselsecretie en tenslotte geen of zeer geringe placentapassage.

Gehoopt mocht dus worden, dat de stof in de kliniek bruikbaar zou blijken voor intubatie en voortgezette spierrelaxatie ook bij sectio caesarea, terwijl zelden of nooit neostigmine nodig zou zijn om de patient te beschermen tegen recurarisatie.

APPENDIX

Myc 1080 werd uitgebreid klinisch onderzocht door Admiraal (1). Deze onderzoeken leerden:

1. intubatie is redelijk goed mogelijk met Myc 1080, echter nog steeds niet zo goed als met succinylcholine.
2. de werkingsduur is kort en door bijspuiten nauwkeurig regelbaar.
3. neostigmine is alleen nodig in die weinige gevallen, waar kort voor het beëindigen van de operatie Myc 1080 was bijgespoten.
4. voor recurarisatie behoeft niet te worden gevreesd.
5. bij sectio caesarea komen de kinderen goed ademend en bewegend ter wereld.
6. de stof geeft bij een aantal patienten een tachycardie, die - hoewel antagoneerbaar met propranolol en zonder nadelige afloop - toch zo hoog opliep dat ervan werd afgezien de stof ter registratie aan te bieden.

Naar de oorzaak van de tachycardie werd geen gericht dierexperimenteel onderzoek verricht; wèl werden in de inleiding van Hoofdstuk XI enige verklaringmogelijkheden geformuleerd gebaseerd op de gevonden farmacodynamische eigenschappen van de stof.

Admiraal, P.V., nog te publiceren.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

This monograph describes pharmacological studies on a promising new peripheral muscle relaxant.

Chapter I considers the requirements which must be met by such a compound if it is to signify a real improvement in anaesthesia. It is postulated that the onset of paralysis should be at least as quick and complete as can be obtained with succinylcholine so that the drug can be employed for intubation of patients at the start of an operation. In addition, the compound should possess a short duration of action, muscle relaxation being maintained as long as required, by supplementary doses of the drug. It would dispense with the present practice of using the depolarising agent succinylcholine for intubation followed by administration of d-tubocurarine or some other competitive muscle relaxant for obtaining the muscle relaxation necessary for the operation itself.

This, besides simplifying the procedure, would also avoid the undesirable antagonism which exists at the motor end-plate between these two classes of compounds. Obviously, it should be possible to reverse the effect of the drug with a specific antagonist, while the drawbacks of the existing muscle relaxants, e.g. histamine release, ganglionic blockade in therapeutic doses, tachycardia, hypotension, excessive salivary and bronchial secretions, should preferably be absent. Moreover, it is desirable that the drug should either not cross the placental barrier at all or should do so only in negligible quantities, so that the drug can be employed for caesarean section and chances of teratogenicity are reduced.

Chapter II gives a general review of neuro-muscular transmission, special attention being paid to those concepts which are the subject of discussion in later chapters. It is followed in Chapter III by a description of the different existing types of muscle relaxants. It was decided that the new compound to be developed should be of the type that competes with acetylcholine for the acetylcholine receptor.

It was already known that conessine, obtained from the bark of *Hollarrhena antidysenterica*, a shrub which grows in India and Central Africa, possesses muscle relaxant activity in high doses. The structural formula is given in Chapter IV. The presence of two nitrogen atoms in this steroid at approximately the same distance as in d-tubocurarine made it likely that mono- or bisquaternisation of the compound would yield potent muscle relaxants. The results of a search through journal and patent literature for other nitrogen-containing steroids with muscle relaxant activity are also described in Chapter IV.

Finally, the chemical structures of 20 new synthetic derivatives of conessine which were examined in a primary screen for muscle relaxant activity, have been given. The compounds were coded with Myc numbers.

The primary screen employed is considered in detail in Chapter V. The in-vivo peroneal nerve-tibialis anterior muscle preparation of cats and dogs was used for the purpose. Single, supramaximal, rectangular stimuli 0.4 msec in duration were applied at regular intervals 4 times a minute. The muscle responses were recorded and used to determine: (a) the latency period (TL_{90}), defined as the interval between intravenous injection of a dose that causes 90% relaxation (RD_{90}) and the moment when maximum relaxation sets in. (b) the T_{50} , i.e., the interval between injection of the drug and the moment when 50% of the maximum effect produced has worn off. Naturally this is dependent upon the dose used. Therefore dose- T_{50} relationships were determined. (c) the inter-relationship between TL_{90} and T_{50} was investigated on the assumption that a compound with a short TL_{90} and a short T_{50} would, just like succinylcholine, be a suitable relaxant for intubation purposes.

Blood pressure, cardiac frequency and ECG recordings were made in order to detect any undesirable side effects.

The following criteria were employed for selection:

1. a short latency period (TL₉₀).
2. a short T₅₀ even with supramaximal doses.
3. negligible or no changes in blood pressure, cardiac frequency and ECG over a wide range of doses.
4. reversibility with specific antagonists (acetylcholinesterase inhibitors).

The experimental set-up described was first used to determine these parameters for a number of reference substances e.g., alcuronium, gallamine, d-tubocurarine, pancuronium and succinylcholine. The Myc compounds were then investigated in the same way.

As was the case with the reference compounds, the Myc compounds also exhibited a positive correlation between the length of the TL₉₀ and the duration of the T₅₀, both in dogs and in cats. Myc 1080 was selected out of the group of compounds with the shortest duration of action and a flat T₅₀ curve over a wide range of doses in both cats and dogs, because of its favourable haemodynamic properties; significant changes in blood pressure and cardiac frequency were exhibited only in doses higher than 5 x RD₉₀.

The investigations required for further evaluation of Myc 1080 are summarized in Chapter VI. These are further elaborated in Chapter VII. The values found in the primary screen were first more accurately determined in a number of experiments. The RD₉₀ in dogs and cats appeared to be approximately equal, 0.42 and 0.46 mg/kg respectively; the corresponding T₅₀ was 6 minutes and the TL₉₀ 1.25 - 1.5 minutes. Supramaximal doses produced 100% relaxation within 30 seconds. The T₅₀ was 15 minutes after a dose of approximately 3 x RD₉₀. The compound is therefore short-acting and, even in supramaximal doses, is comparable to succinylcholine. This raises hopes, but offers no certainty, that the compound may be suitable both for intubation and for maintenance of relaxation in man. It appeared probable from the results of the primary screening that the compound belonged to the group of competitive, non-depolarising neuromuscular blocking agents. Compounds belonging to this class can be distinguished from the other types by the following characteristics: they produce flaccid paralysis without fasciculations in mammalian, avian and frog muscles and can be antagonized by anticholinesterases and by depolarising agents like succinylcholine. The interval between injection and onset of paralysis is short, while inhibition of cholinesterase is weak.

Myc 1080 exhibits the known characteristics of competitive blocking agents both in vivo (peroneal nerve-tibialis muscle of cats and dogs) and in vitro (chicken semispinalis muscle and frog rectus abdominis muscle).

Inhibition of acetylcholinesterase was measured in vitro (human erythrocytes) by the method of Jensen-Holm. Myc 1080 was found to be 550 times weaker than neostigmine and 8 times as strong as d-tubocurarine. It was calculated that inhibition of cholinesterase would become manifest at a dose of about 3 mg/kg, i.e., 6 x RD₉₀. This leads to the conclusion that neuromuscular blockade produced by Myc 1080 is not primarily caused by inhibition of acetylcholinesterase. This is in agreement with the results of the other experiments. There are indications that in vivo the margin between ganglionic blockade and acetylcholinesterase inhibition is small, so that with higher doses, a dual effect may be expected on the ganglion.

Chapter VIII deals with investigations aimed at detection of a number of side-effects. Histamine liberation could not be demonstrated in either guinea-pigs injected with doses up to 20 mg/kg i.v., using the method of Konzett Rössler, or in human volunteers injected intra-dermally with 10 µg. Following 100 mg/kg i.p. in rats (Fawcett's method) a small amount of histamine was released from the mast cells of the peritoneum. However, it possessed only 1/100 of the activity of d-tubocurarine in this respect. The rectus abdominis muscle of the frog stimulated by nicotine was employed as an in vitro model for ganglion blocking activity; the frog rectus abdominis muscle stimulated by succinylcholine was used to determine neuromuscular blocking activity. The ratio between the two activities was found to be 1.74. When the ratio was determined in vivo using preganglionic

stimulation of the nictitating membrane and indirect stimulation of the tibialis anterior muscle in the cat, a value of approximately 5 was found. This latter corresponds to the ratio between the dose at which significant haemodynamic effects become manifest and the RD₉₀. No investigations were carried out on the effect of the drug on stimulation of salivary and bronchial secretions because in vitro experiments on rat ileum had demonstrated that the anti-muscarinic activity of Myc 1080 begins at about the same dose as that required for neuromuscular blockade. Therefore, supramaximal doses would be expected to reduce these secretions. A cumulative effect is improbable because no increase in the T₅₀ was found in dogs after repeated doses of the RD₉₀ (= 0.5 mg/kg) at intervals of 15 minutes. Myc 1080 either does not pass the placental barrier or does so in negligible quantities. This was demonstrated by caesarean section in the rat and dog after injection of 5 mg/kg. Following delivery respiration and movements were unaffected in the young.

The results of toxicological investigations are described in detail in Chapter IX. The difficulty in carrying out toxicological investigations with muscle relaxants lies in the necessity to maintain respiration artificially under light general anaesthesia. This makes the interpretation of any eventual abnormalities difficult, if not impossible. Therefore, in the case of the dogs, only single doses of 2.5, 5 or 10 mg/kg were administered. Haematology, liver functions, urine and ECG were studied before, and at various intervals after drug administration. After 6 weeks autopsy was carried out and the organs were examined macroscopically and microscopically. The only abnormality found was the presence of siderosis in the reticulo-endothelial cells of the liver. This led to a special investigation directed at this phenomenon, including examination of red cells for evidence of increased osmotic fragility both in vitro and in vivo. The siderosis could not be confirmed, nor was there any evidence of an increase in the osmotic fragility of the erythrocytes.

Myc 1080 was administered in rats for 3 weeks in doses of 3, 6 and 12 mg/kg, the Keuskamp respirator for children being used to provide artificial respiration. The parameters studied included change in body weight, haematology, liver functions, composition of the urine and vaginal smears. At the end of the experiment, macroscopic and microscopic examinations of the organs were carried out, special attention being paid to the weight and histology of the endocrine glands and the primary and secondary sex organs.

Except for reduced weight gain in males and actually weight loss in females, no abnormalities were found which could be ascribed to toxic effects of the drug. In an experiment directed at elucidating the mechanism of the weight loss it appeared that this was a result of diminished appetite which in turn appeared to be associated with the halothane anaesthesia and artificial respiration, although intestinal stasis resulting from the parasympatholytic and ganglionic blocking properties of the drug also appeared to play a role. No changes were found to indicate that the steroidal Myc 1080 possessed any hormonal side-effects.

Because it is possible that decomposition products might form during storage of ampoules, heat-degraded Myc 1080 was investigated in an acute toxicity study in mice and a 7-day subacute toxicity study in dogs, using large doses of the degraded material. The animals were observed for 6 weeks and the urine and blood were investigated. Autopsy was carried out at the end of the observation period, organs being examined macroscopically and microscopically. No toxic changes were found. The LD₅₀ of the degraded material was 40 mg/kg. This is much higher than the LD₅₀ of unaltered Myc 1080 (1.5 mg/kg).

Chapter X gives an account of the fate of C¹⁴ labelled Myc 1080. Studies were carried out on blood levels and excretion via expiration (C¹⁴O₂ concentrations), urine and faeces in rats with ligated and unligated bile ducts, with biliary fistulas or with ligated renal arteries.

Observations carried out over 10 days indicated the following pattern of excretion.

expiratory air	0%
urine	25%
biliary excretion	55%
diffusion into alimentary tract	10%
	<hr/>
	90%

Blood levels exhibited a transient peak followed by a gradual decline. No obvious indications of metabolism of the drug were found. The compound is quickly excreted in urine and bile, but the short action of the compound is not explicable on this basis; serum binding is also not an explanation because a dialysis experiment demonstrated that only 2% of the drug is bound to serum proteins at physiological pH.

Autoradiographic investigations revealed that following i.v. injection Myc 1080 is distributed in the extracellular space with obvious affinity for connective and supporting tissues. This is followed by quick redistribution and accumulation of the compound in the liver and kidneys. These organs gradually excrete the compound, via the urine with a $T_{1/2} = 108$ and via bile with a $T_{1/2} = 71$ hours. This redistribution occurs so fast that it can fully explain the short duration of action of Myc 1080.

Autoradiographic experiments with pregnant rats at different stages of pregnancy showed that Myc 1080 passes into the implantations at an early stage of placentation (7 days post coitum). It was not possible to distinguish if the compound had accumulated in the placenta or in the foetus or in both. At later stages of pregnancy (13 and 20 days post coitum) the placenta formed a more or less impermeable barrier for the compound. A few experiments in cats and dogs revealed an excretion pattern which was generally in agreement with that in rats.

Interaction experiments with the acid mucopolysaccharide heparin showed that Myc 1080 possessed an affinity for these macromolecules. Since it is known that the motor end-plate region is rich in mucopolysaccharides, the binding of Myc 1080 in this area was investigated. Mouse diaphragms were removed at various intervals after i.v. injection of C^{14} labelled Myc 1080 and examined autoradiographically by Waser's method. The structures which were considered to be receptors by Waser were indeed visualised. However, it was striking that radioactivity did not decrease but rather increased at time intervals when the effect of the drug on the gastrocnemius muscle had worn off. This militates against Waser's view that the structures visualised are receptors. Myc 1080 is probably quickly attached not only to the receptors but also to the acid mucopolysaccharides in the end-plate region. Even after the compound has disappeared from the receptors, radioactivity apparently remains bound to the secondary structures in the vicinity of the receptor for fairly long periods of time.

It is known from clinical observations that other drugs used in anaesthesia can influence the activity of muscle relaxants. For the benefit of the anaesthetist who would have to carry out the first clinical trials in man, a number of orientating experiments were done in cats and dogs in vivo and on the rat phrenic nerve-diaphragm preparation in vitro to determine the interactions of Myc 1080 with the following compounds: succinylcholine, atropine, ether, nitrous oxide, halothane, morphine, meperidine, chlorpromazine, promethazine, diazepam, chlordiazepoxide, hexamethonium and streptomycin (Chapter XI). The results were compared with the information (where available and comparable) in the literature about other neuromuscular blocking agents of the same type. This led to the conclusion that paralysis and duration of action were affected in an identical fashion in the case of Myc 1080 as was the case with other muscle relaxants such as d-tubocurarine and gallamine. Effects of interactions of drugs on blood pressure and cardiac frequency are only sporadically mentioned in the literature so that comparison was difficult. No differences were found between Myc 1080 and other relaxants of the same type, while some similarities were demonstrable.

It may be concluded that Myc 1080 fulfils the requirements set out in Chapter I: quick onset of action, short duration of effect, reversibility with acetylcholinesterase inhibitors, little tendency to accumulation so that the duration of effect can be easily regulated with additional injections, absence of histamine liberation, negligible effects on blood pressure, cardiac frequency and ECG in therapeutic doses, no stimulation of salivary and bronchial secretions and finally little, if any, placental passage.

It may therefore be expected that the compound will prove useful in the clinic both for intubation and for maintenance of muscle relaxation in operative procedures (including caesarean sections) while neostigmine will be seldom, if ever, required to protect patients against recurarisation.

Clinical investigations (P.V. Admiraal, to be published) indicated that while intubation is possible under the influence of Myc 1080, it is not so easy as in the case of succinylcholine. The duration of action of Myc 1080 is short and relaxation can be accurately regulated with supplementary doses, so that neostigmine is only required in the few cases where a supplementary dose of Myc 1080 was administered shortly before the end of the operation. There is no danger of recurarisation. Respiration and movements are unaffected in babies delivered by caesarean section from mothers injected with Myc 1080. However, the drug caused tachycardia in some patients and although this tachycardia was antagonised by propranolol and had no deleterious consequences, it was of such intensity that plans to apply for registration of the drug were abandoned.

Animal experiments aimed at elucidation of the cause of the tachycardia have not been done; however some possible explanations for the phenomenon are mentioned in the introduction to Chapter XI.

OVERZICHT VAN DE GERAADPLEEGDE LITERATUUR

- Alam, M., Anrep, G.V., Barsoum, G.S., Talaat, M. & Wieninger, E., *J. Physiol.*, 95 (1939), 148.
- Alderson, A.M. & MacLagan, J., *J. Physiol.*, 173 (1964), 38.
- Ariëns, E.J., Rossum, J.M. van & Simonis, A.M., *Arzneim. Forsch.*, 6 (1956), 282.
- Ariëns, E.J., Rossum, J.M. van & Simonis, A.M., *Arzneim. Forsch.*, 6 (1956), 611.
- Ariëns, E.J., *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 113 (1969), 1774.
- Ariëns, E.J., *J. Mond. Pharm.*, 12 (1969), nr. 3, 263.
- Baird, W.L.M. & Reed, A.M., *Brit. J. Anaesth.*, 39 (1967), 775.
- Baker, S.B. de C., *Proc. Europ. Soc. Study Drug Tox.*, Vol. XI (1970), 52.
- Baker, S.B. de C. & Davey, D.G., *Brit. Med. Bull.*, 26 (1970), 208.
- Bamford, D.G., Biggs, D.F., Davis, M. & Parnell, E.W., *Brit. J. Pharmacol.*, 30 (1967), 194.
- Barlow, R.B. & Ing, H.R., *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948), 298.
- Bertho, A., *Ann. Chem. Pharm.*, 555 (1944), 214.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H. & Brock, M., *J. Biol. Chem.*, 164 (1946), 321.
- Bezzi, G. & Gessa, G.L., *Antibiot. Chemother.*, 9 (1961), 710.
- Blair, D.C., Barnes, R.W., Lincoln-Wildner, E. & Murray, W.J., *J. Amer. Med. Ass.*, 215 (1971), 251.
- Blanc, A., *Anesth. Analg. Reanim.*, 23 (1966), 909.
- Blanpin, O. & Bretandeu, J., *Soc. Biol. Poitiers*, (1961), 878.
- Bonta, I.L., Goorissen, E.M. & Derkx, F.H., *Eur. J. Pharmacol.*, 4 (1968), 83.
- Bonta, I.L., "Verdwijnende kloven", (1970), Rotterdam.
- Bowman, W.C., Rand, M.J. & West, G.B., *Textbook of Pharmacology*, 4th printing (1971), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.
- Bray, G.A., *Anal. Biochem.*, 1 (1960), 279.
- Brown, B.R. & Crout, J.R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172 (1970), 266.
- Buckett, W.R., Hewett, C.L. & Savage, D.S., *Chim. Ther.*, 2 (1967), 186.
- Buckett, W.R., Marjoribanks, C.E.B., Marwick, F.A. & Morton, M.B., *Brit. J. Pharmacol.*, 32 (1968), 671.
- Bülbring, E., *Brit. J. Pharmacol.*, 1 (1946), 38.
- Burn, J.H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6 (1914/1915), 305.
- Burn, J.H., *Proc. Roy. Soc. Med.*, 47 (1954), 617.
- Busfield, D., Child, K.J., Clarke, A.J., Davis, B. & Dodds, M.G., *Brit. J. Pharmacol.*, 32 (1968), 609.
- Cabaud, P.G. & Wróblewski, F., *Amer. J. Clin. Pathol.*, 30 (1958), 234.
- Chagas, C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81 (1959), 345.
- Cheymol, J., Driëssche, J. van den, Allain, P. & Eben Moussi, E., *Anesth. Analg. Reanim.*, 24 (1967), 329.
- Child, K.J. & Zaimis, E.J., *Brit. J. Pharmacol.*, 15 (1960), 412.
- Cohen, E.N., Hood, N. & Golling, R., *Anaesthesiol.*, 29 (1968), 987.
- Cookson, J.C. & Paton, W.D.M., *Anaesthesia* 24 (1969), 395.
- Courvoisier, S., Fournel, J., Ducrot, R., Kolsky, M. & Koetschet, P., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 92 (1953), 305.
- Debro, J.R., Tarver, H. & Korner, A., *J. Lab. Clin. Med.*, 50 (1957), 728.
- Derkx, F.H.M., Bonta, I.L. & Lagendijk, A., *Eur. J. Pharmacol.*, 16 (1971), 105.
- Dollery, C.T. & Davies, D.S., *Brit. Med. Bull.*, 26 (1970), 233.
- Dorfman, R.I., *Methods in Hormone Research*, vol. II (1962), 709.
- Everett, A.J., Lowe, L.A. & Wilkinson, S., *Chem. Commun.*, 16 (1970), 1020.
- Fawcett, D.W., *J. Exp. Med.*, 100 (1954) 217.
- Foldes, F.F., in "Curare", *Symposium der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften*, Zurich (1966), Schwabe Verlag, Basel.

- Frederickson, R.C.A. & Pinsky, C., *Nature* 231 (1971), 93.
 Frederickson, R.C.A. & Pinsky, C., *Nature* 231 (1971), 94.
 Froberg, H., *Pharm.Ind.*, 32 (1970), 1.
 Gill, E. & Ing, H.R., *Il Farmaco Ed.Sci.*, 13 (1958), 244.
 Gordon, M., *Psychopharmacological Agents* (1967), in: *Medicinal Chemistry*, 4.
 Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M., *J.Biol.Chem.*, 177 (1949), 751.
 Gorter, E. & De Graaff, W.C., *Klinische Diagnostiek* 15 (1947), 6e Ed., I, 12.
 Griffith, H.R., Cullen, W.G. & Pelt, P., *Canad.Anaesth.Soc.J.*, 3 (1956), 346.
 Guyton, A.C., *Textbook of Medicinal Physiology*, 3rd Ed. (1968), Saunders, Philadelphia.
 Hall, L.W., Woolf, M., Bradley, J.W.P. & Jolly, D.W., *Brit.Med.J.*, 2 (1966), 1305.
 Hanley, T., Udall, V. & Weatherall, M., *Brit.Med.Bull.*, 26 (1970), 203.
 Henry, R.J., Chiamori, N. & Ware, A.G., *Amer.J.Clin.Pathol.*, 32 (1959), 201.
 Hespe, W. & Wieriks, J., *Biochem.Pharmacol.*, 20 (1971), 1213.
 Hobbiger, F., cit. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. XV (1963), 391.
 Hodgkin, A.L., *The Sherrington Lectures VII* (1967), Liverpool Univ. Press.
 Hughes, R., *Brit.J.Anaesth.*, 42 (1970), 826.
 Jeffay, H. & Alvarez, J., *Anal.Chem.*, 33 (1961), 612.
 Jensen-Holm, J., *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 18 (1961), 379.
 Jongh, D.K. de, in *Medicinal Chemistry, a series of Monographs - nr. 3*, edited by E.J.Ariëns.
 Katz, R.L., *Anaesthesiol.*, 27 (1966), 52.
 Katz, R.L., *Anaesthesiol.*, 28 (1967), 564.
 Khuong, F. & Pinto-Scognamiglio, W., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 147 (1964), 209.
 Kingsley, G.R., *J.Biol.Chem.*, 137 (1939), 197.
 Koelle, G.B. & Friedenwald, J.S., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 70 (1949), 617.
 Koelle, G.B., (1962), cit. Goodman, L.S. & Gilman, A., "The pharmacological Basis of Therapeutics", 4th Ed., (1970), p. 420.
 Konzett, H. & Rössler, R., *Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.*, 195 (1940), 71.
 Kopera, J. & Armitage, A.K., *Brit.J.Pharmacol.*, 9 (1954), 392.
 Lammers, W., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 99 (1954), 328.
 Lawler, H.C., *J.Biol.Chem.*, 234 (1959), 799. Cit. *Handbuch exp. Pharmakol.*, XV (1963), 706.
 Levin, A.P. & Jandorf, B.J., *Handbuch der Exper. Pharmakologie*, Vol. XV (1963), 400.
 Lewis, J.J., Martin-Smith, M., Muir, T.C. & Ross, H.H., *J.Pharm.Pharmacol.*, 19 (1967), 502.
 Liljestrand, A., *Proc.Europ.Soc.Study Drug Tox.*, Vol. XI (1970), 51.
 Linszen, G.H., *Academisch Proefschrift* (1961), Nijmegen.
 Litchfield, J.T. & Wilcoxon, F., *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 96 (1949), 99.
 Litchfield, J.T., *J.Amer.Med.Ass.*, 177 (1961), 104.
 Marx, A.F., Waard, W.F.v.d. & Flines, J. de, *Steroids*, 8 (1966), 391.
 Marx, A.F., Waard, W.F.v.d. & Flines, J. de, *Steroids*, 8 (1966), 421.
 Meyer, D.K.F. & Weitering, J.G., *Eur.J.Pharmacol.*, 10 (1970), 283.
 Meyler, F.L., *Dissertatie* (1960), Amsterdam.
 Naess, K., *Acta Physiol.Scand.*, 19 (1950), 187.
 Noach, E.L., *International Symposium on Clinical Pharmacology*, Brussels (1970), 34.
 Noel, P.R.B., *Proc.Europ.Soc.Study Drug Tox.*, Vol. XI (1970), 57.
 Paton, W.D.M. & Zaimis, E.J., *Brit.J.Pharmacol.*, 4 (1949), 381.
 Paton, W.D.M. & Zaimis, E.J., *J.Physiol.*, 112 (1951), 311.
 Paton, W.D.M., *Pharmacol.Rev.*, 9 (1957), 269.
 Peters, L., *Pharmacol.Rev.*, 12 (1960), 1.
 Pluchon, J.P. & Pille, G., *Ann.Pharm.Fr.*, 8 (1950), nr. 1, 741.
 Polstorff, K. & Schirmer, P., *Ber.Deut.Chem.Ges.*, 19 (1866), 78.
 Rang, H.P. & Ritter, J.M., *Molec.Pharmacol.*, 5 (1969), 394.
 Reitman, S. & Frankel, S., *Amer.J.Clin.Pathol.*, 28 (1957), 56.
 Riker, W.F.Jr. & Wescoe, W.C., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 54 (1951), 373.
 Rossum, J.M. van & Ariëns, E.J., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 118 (1959), 393.
 Rossum, J.M. van & Ariëns, E.J., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 118 (1959), 447.
 Ruch, Th.C. & Patton, H.D., *Physiology and Biophysics*, 19th Ed. (1966), Saunders, Philadelphia.

- Rutkowski, R.B. & De Baare, L., *Clin.Chem.*, 12 (1966), 432.
- Sansone, M., Aulisio, G.A. & Marino, A., *Boll.Soc.Ital.Biol.Sper.*, 43 (1967), 236.
- Saxena, P.R. & Bonta, I.L., *Eur.J.Pharmacol.*, 11 (1970), 332.
- Schanker, L.S., *Pharmacol.Rev.*, 14 (1962), 501.
- Schanker, L.S., *Amer.J.Physiol.*, 204 (1963), 829.
- Secher, O., *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 6 (1950), 371.
- Secher, O., *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 7 (1951), 103.
- Seligson, D., Merina, J. & Dodson, E., *Clin.Chem.*, 3 (1957), 638.
- Smythies, J.R., *Eur.J.Pharmacol.*, 14 (1971), 268.
- Steinbereithner, K., *Bull.Schweiz.Akad.Med.Wiss.*, 23 (1967), 57.
- Stephenson, R.P., *Brit.J.Pharmacol.*, 3 (1948), 237.
- Stephenson, R.P. & Dutta, N.K., *Brit.J.Pharmacol.*, 3 (1948), 326.
- Timmerman, J.C., Long, J.P. & Pittinger, C.B., *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 1 (1959), 299.
- Udall, V., *Proc.Europ.Soc.Study Drug Tox.*, Vol. 1 (1970), 70.
- Ullberg, S., *Acta Radiol.*, suppl. 118 (1954).
- Vrbová, G., *J.Physiol.*, 169 (1963), 513.
- Wang, C.H. & Jones, D.E., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1 (1959), 203.
- Waser, P.G., *Schweiz.Med.Wochenschr.*, 87 (1957), 577.
- Waser, P.G. & Lüthie, U., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 112 (1957), 272.
- Waser, P.G., *J.Pharm.Pharmacol.*, 2 (1960), 577.
- Waser, P.G., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 144 (1967), 737.
- Wróblewski, F. & LaDue, J.S., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 90 (1955), 210.
- Zaimis, E.J., *J.Physiol.*, 122 (1953), 238.
- Zijlstra, W.G. & Kampen, E.J. van, *Clin.Chim.Acta*, 5 (1960), 719.
- Zijlstra, W.G. & Kampen, E.J. van, *Clin.Chim.Acta*, 6 (1961), 538.
- Zijlstra, W.G. & Kampen, E.J. van, *Clin.Chim.Acta*, 7 (1962), 96.

Curriculum vitae

De auteur van dit proefschrift, Jacob Wieriks, werd geboren te Pijnacker op 20 juli 1919. Na het doorlopen van de 5-jarige HBS-B te Rotterdam werkte hij vanaf 1938 gedurende enige jaren bij de Twentsche Bank N.V. te Rotterdam. Vervolgens was hij werkzaam bij de N.V. Philips Gloeilampenfabriek te Eindhoven, in de radiobuizen-, later in de röntgentechniek. Inmiddels gehuwd, begon hij pas na de tweede wereldoorlog met zijn studie in de Geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden. Deze studie werd in 1958 bekroond met het artsdiploma. Daarna werkte hij bij Prof. Dr. D.K. de Jongh op het Farmacologisch Laboratorium van de Amsterdamsche Chinine Fabriek N.V. te Amsterdam. In 1961 werd hij verbonden aan de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V. te Delft, waar hij het Farmacologisch Laboratorium opbouwde. Na de fusie van de KNG&SF met de N.V. Koninklijke Pharmaceutische Fabrieken v/h Brocades-Stheeman & Pharmacia tot Gist-Brocades N.V. werden de researchafdelingen van beide partners samengevoegd. In deze nieuwe organisatie werd hem de leiding opgedragen over de Farmacologische Laboratoria in Delft en Haarlem, de afdelingen Toxicologie, Tracer- en Biochemie in Haarlem en de Medisch-Bacteriologische afdeling in Delft.