

Verneveling als toedieningsvorm in de geanestheseerde hond

bruikbaarheid voor evaluatie van pulmonaire en cardiovasculaire neveneffecten

Denise Vogel¹, Henk van der Linde², Bruno Van Deuren², Ard Teisman², David Gallacher²

¹Agro- en Biotechnologie, Dierenzorg, Thomas More Kempen, Geel, België

²Safety Pharmacology Research, Translational Sciences, Janssen, Beerse, België

Contactpersoon: H. van der Linde, hvdlinde@its.jnj.com

Samenvatting

Sommige geneesmiddelen vragen om een specifieke toedieningsvorm. Bijvoorbeeld bij sommige ziekten die zich manifesteren in de longen (longkanker of virusinfecties in de longen), of als het geneesmiddel het milieu in het maag-darmkanaal niet goed verdraagt of niet goed wordt opgenomen. In die gevallen kan rechtstreekse toediening in de luchtwegen, door middel van verneveling/inhalatie, een goed alternatief zijn. Aangezien deze toedieningsvorm van een geneesmiddel gepaard gaat met een heel ander opnameprofiel, is het van belang om eventuele cardiovasculaire (met betrekking tot het hart en de bloedvaten) en pulmonaire (met betrekking tot de longen) bijwerkingen te bekijken voordat een dergelijk geneesmiddel aan de mens wordt gegeven. Daarom werd een geanestheseerde hondenmodel, dat gebruikt wordt om de pulmonaire en cardiovasculaire (neven-) effecten te bepalen na iv-toediening van geneesmiddelen, aangepast zodat ook aerosols kunnen worden toegediend. Om dit aangepaste hondenmodel te valideren werden twee referentiestoffen geselecteerd, namelijk salbutamol en methacholine. Salbutamol is een β -adrenoreceptoragonist en relaxeert de luchtwegen (bronchodilator). Als bijwerking van dit product wordt een stijging in ritme en contractiekracht van het hart gezien. Deze bijwerkingen waren ook waarneembaar na verneveling bij de geanestheseerde hond. Helaas konden we niet de relaxerende werking op de luchtwegen van salbutamol in ons model aantonen. Als bronchoconstrictor (stof die de luchtwegen vernauwt) hebben we de muscarine-agonist; methacholine gebruikt. Verneveling van methacholine heeft geen bijwerkingen op het hart en dit werd ook niet waargenomen in ons model. Wel werden, zoals verwacht, effecten op de longfunctie parameters gevonden. De weerstand in de luchtwegen, de ontwikkelde druk in de longen en de longarbeid (hoeveelheid energie die de ventilator nodig heeft om 1 liter lucht in de longen te pompen) namen »

toe, terwijl de rekbaarheid van de longen (de longcompliantie) afnam, welke alle duiden op een duidelijke vernauwing van de luchtwegen. Om het effect van salbutamol op de longfunctie te kunnen aantonen werd er een combinatie gegeven van methacholine en salbutamol. Uit deze studie bleek dat de door methacholine opgewekte vernauwing van de luchtwegen gedeeltelijk kon worden opgeheven door de relaxerende werking van salbutamol. We kunnen dan ook concluderen dat vernevelen van geneesmiddelen in dit hondenmodel toegepast kan worden om pulmonaire en cardiovasculaire bijwerkingen te onderzoeken, met de opmerking dat bij bronchodilators een combinatie met een bronchoconstrictor noodzakelijk is.

Inleiding

Voordat een potentieel nieuw geneesmiddel in mensen getest mag worden (in zogenaamde klinische studies), moet de veiligheid en het bijwerkingprofiel ervan grondig gecontroleerd worden. De daarvoor gebruikelijke methoden en technieken zijn uitgebreid beschreven in zogenaamde 'ICH - Guidelines' (International Conference on Harmonisation) die door de regelgevende autoriteiten als richtlijnen gelden. Een belangrijk onderzoeksgebied voor de ontwikkeling van geneesmiddelen is het bekijken van de eventuele cardiovasculaire bijwerkingen, omdat het hier gaat om een vitaal (essentieel voor het leven) orgaanstelsel. Cardiovasculair veiligheidsonderzoek omvat een breed spectrum aan testen, waaronder zowel in vitro als in vivo-modellen vallen. Een belangrijk in vivo-model, waarbij een goed overzicht van de cardiovasculaire bijwerkingen wordt verkregen, is het geanestheerde hondenmodel. Vooral omdat dit model toelaat om in één dier een hele reeks parameters te meten (inclusief de cardiovasculaire en pulmonaire), en het tegelijkertijd ook mogelijk maakt om een hele reeks van concentraties te testen onder heel stabiele condities en zonder psychische belasting voor het dier. Doorgaans worden kandidaat-medicijnen in dit model intraveneus toegediend. Er zijn echter ook medicijnen die bedoeld zijn om hun werking plaatselijk in de longen uit te oefenen. Bijvoorbeeld bij ziekten die zich manifesteren in de longen (longkanker of virusinfecties in de longen) of als de stof het maagdarmstelsel niet doorstaat en hier niet goed wordt opgenomen. Indien dergelijke geneesmiddelen lokaal in de longen als aerosol toegediend worden, kan er met een veel kleinere dosering gewerkt worden. Tot op heden was echter niet bekend of deze toedieningsvorm ook gebruikt kon worden in een geanestheerde hondenmodel. Daarom hebben wij dit model verder ontwikkeld zodat het mogelijk is om stoffen in vernevelde vorm (als aerosol) toe te dienen en vervolgens de pulmonaire- en cardiovasculaire effecten en neveneffecten te onderzoeken.

Om dit model te valideren zijn de (bij)werkingen van twee klinisch gekende referentiestoffen, te weten salbutamol en methacholine, na verneveling onderzocht. Salbutamol is een selectieve β -adrenoreceptoragonist (1). De adrenoreceptoren behoren tot het sympatische zenuwstelsel. Algemeen bekend is dat na stimulering van deze receptoren de bloeddruk en hartslag zullen stijgen (om het lichaam klaar te maken om te vechten of te vluchten, de zogenaamde *fight or flight-reactie*). Tegelijkertijd heeft salbutamol ook een relaxerende werking op de bronchiale spieren zodat er meer zuurstof opgenomen kan worden, wat ten gunste komt van de ademhaling. Van salbutamol is bekend dat het, bij lokale toediening in de longen, een verlengd bronchodilaterend (verwijdend) effect heeft. Er is beschreven dat dit effect na lokale toediening zelfs meer uitgesproken is dan toediening van eenzelfde intraveneuze dosis. Hierdoor is het economisch beter om salbutamol als aerosol toe te dienen (2). Salbutamol is de werkzame stof in verschillende astmamedicatie zoals bijvoorbeeld Ventolin® (GlaxoSmithKline, Engeland).

Methacholine is een niet-selectieve muscarine-agonist. De muscarinereceptoren behoren tot het parasympatische zenuwstelsel en stimulatie hiervan zorgt onder meer voor een verlaging van de ademhalingsfrequentie. Van methacholine is aangetoond dat deze stof een constrictie (vernauwing) geeft van de luchtwegen. Hiervoor wordt methacholine (zoals bijvoorbeeld Provocholine®, Methapharm, U.S.A.) gebruikt in een provocatietest om de aanwezigheid en de ernst van luchtweghyperreactiviteit te meten.

Dit artikel beschrijft de toepasbaarheid van een geanestheerde hondenmodel om cardiovasculaire en pulmonaire parameters te meten na toediening van stoffen door middel van verneveling. De methode van het vernevelen en de effecten van methacholine en salbutamol op de verschillende fysiologische parameters worden gepresenteerd en uitgebreid besproken.

Materiaal en methoden

DIEREN

Alle studies zijn uitgevoerd in overeenkomst met 'de Europese Conventie ter bescherming van gewervelde dieren die gebruikt worden voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden', en met 'the Appendices A and B', opgemaakt in Strasbourg op 18 maart 1986. In alle experimenten is er gewerkt met gezonde beagles, zowel reuen als teven, met een gemiddeld lichaamsgewicht van $11 \pm 1,6$ kg. De dieren ($n = 20$) zijn 12 uur voor de operatie niet gevoederd, maar hadden wel vrije toegang tot drinkwater.

ANESTHESIE EN INTUBATIE

De anesthesie gebeurt volgens het FEAB-model (Fentanyl Etomidate Anesthetised Beagle model) zoals uitgebreid beschreven in de literatuur (3). Hierbij wordt de anesthesie intraveneus geïnduceerd via de *Vena saphena lateralis* in de linkerachterpoot. Als totale intraveneuze anesthesie wordt een mengsel gegeven van 0,070 mg/kg lofentaniil (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse België) samen met 0,015 mg/kg scopolamine (Alcon Laboratories, Texas U.S.A.) en 1,0 mg/kg succinylcholine (Lysthenon 5%, Nycomed, Duitsland). De onderhoudsanesthesie bestaat uit een infuus van 1,5 mg/kg/h etomidaat (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse België) en 0,025 mg/kg/h fentanyl (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse België).

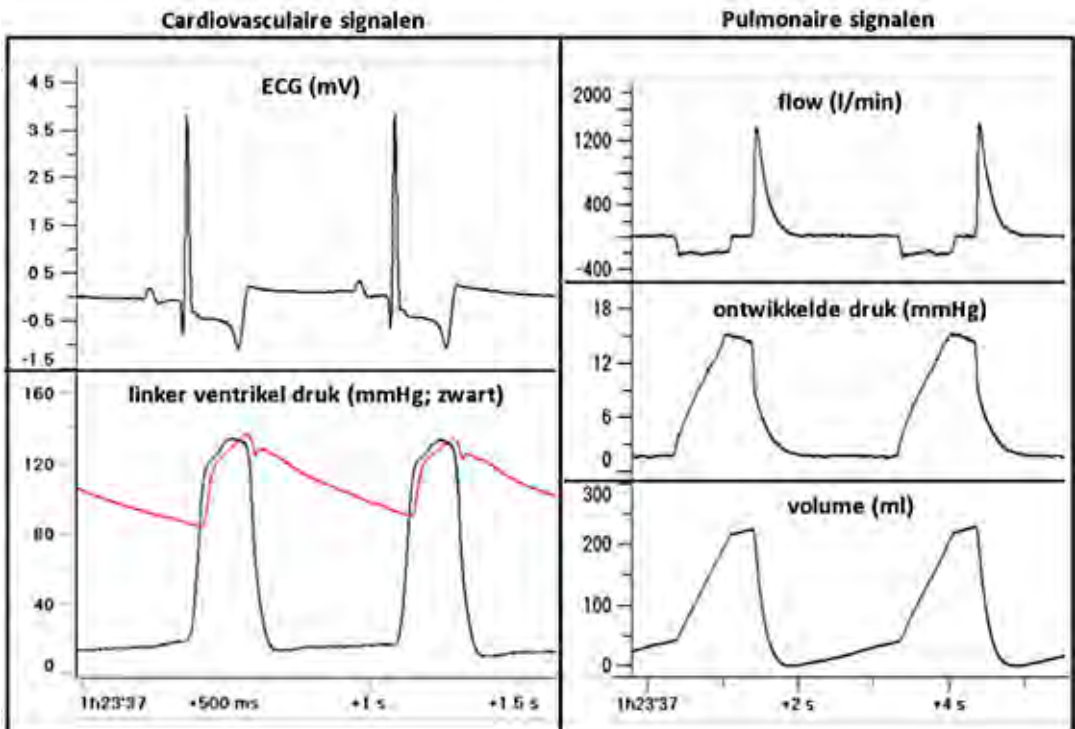
Na het toedienen van de anesthesie wordt de hond op de rechterzij op de operatietafel gelegd, geïntubeerd met een tracheotube (FR34, ID 8.5, Kruuse, Denemarken) en onmiddellijk beademd door middel van een respirator (Servo ventilator 900C, Siemens, Duitsland). De lichaamstemperatuur van de hond wordt tussen 37 tot 38°C gehouden door middel van een thermostatisch gecontroleerde warmwatermatras.

CHIRURGIE

De hond wordt geschoren ter hoogte van beide liesstreken en in zowel de linker- als de rechter halsstreek. In de geschoren gebieden worden de rechter en linker *Vena femoralis*, rechter en linker *Arteria femoralis*, rechter en linker *Arteria carotis* en de linker *Vena jugularis* vrijgeprepareerd door middel van elektrocoagulatie, om bloedingen te minimaliseren. Hierna worden de ECG-naalden geplaatst en aangesloten op een versterker (Emka, Frankrijk).

Als eerste wordt een katheter geplaatst die ook gebruikt wordt om het dier van de onderhoudsanesthesie te voorzien. Deze zogenaamde Swan-Ganz-katheter die voorzien is van een temperatuursensortip (131HF7, Edwards Lifesciences, USA) wordt in de rechter *Vena femoralis* ingebracht. Via het rechteratrium en ventrikel wordt de tip vervolgens in de *Arteria pulmonalis* geplaatst. Met deze katheter worden de lichaamstemperatuur, pulmonaire arterie druk en de cardiac output (bloedvolume dat per minuut uit elke ventrikel wordt gepompt) gemeten. In de rechter *Arteria femoralis* wordt een open lumen katheter geplaatst met een driewegkraan en een spuit zodat er gemakkelijk arteriële bloedstalen genomen kunnen worden. Die bloedstalen kunnen geanalyseerd worden in een bloedgasanalyser (ABL700, Radiometer, Denemarken) voor de bepaling van elektrolyten en bloedgassen of ter bepaling van de plasmaconcentratie van de toegediende stoffen. Via deze open lumen katheter wordt ook 500 IU/kg heparine als anticoagulator toegediend. In de linker *Vena femoralis* wordt een injectiekatheter ingebracht die doorloopt tot tegen het atrium. Een kathetertip micromanometer (MTC800, Dräger, Duitsland) wordt in de aortaboog geplaatst via de linker *Arteria femoralis* om de bloeddruk in de Aorta te meten. Via de *Vena jugularis* compenseert men het vochtverlies (ondermeer door de staalnames van bloed) »

door een continu infuus te geven van 1,25 ml/kg/h van 10% Gentrin-40® (Baxter B.V., Nederland) en 5% glucoseoplossing. De rechter *Arteria carotis* wordt vrijgeprepareerd en omsloten door een flowmeter (T206, Transonic Systems, USA) die de bloedstroom meet. Via de linker *Arteria carotis* wordt een tip micromanometer pigtail-katheter geplaatst in het linkerventrikel om daar de druk te meten. Alle katheters worden correct gepositioneerd met behulp van fluoroscopie (Siremobil2000, Siemens, Duitsland). Een selectie van de verkregen signalen is weergegeven in Afbeelding 1.



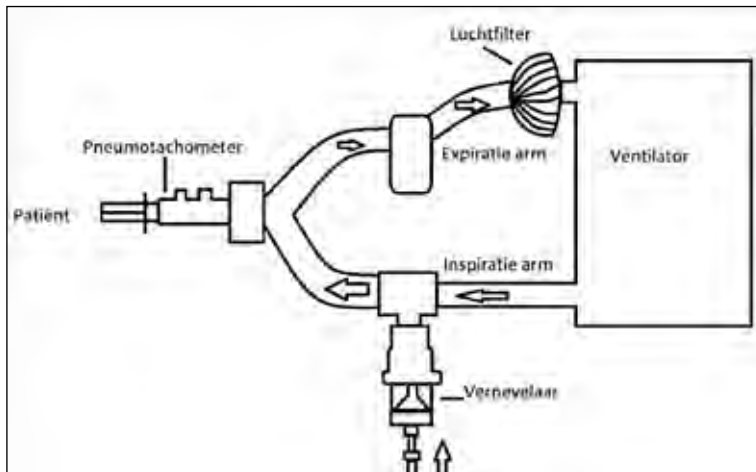
Afbeelding 1. Basissignalen van enkele cardiovasculaire signalen; electrocardiogram (ECG) en linker ventrikel druk (zwart signaal) en enkele pulmonaire signalen; flow, ontwikkelde druk en volume. Alle opgenomen met het Notocord software programma.

BEADEMING

De hond wordt beademd met een vast volume van 3 tot 4 l/min met een 70/30 mengsel van lucht/zuurstof en de frequentie wordt ingesteld op 20 respiraties/min. Het ademvolume van de ventilator wordt zo ingesteld dat de koolstofdioxide uitstoot tussen de 4,5 en 5,0% ligt. Om het dichtslaan van de dieper gelegen longblaasjes tegen te gaan wordt er om de 100 ademhalingen een 'diepe zucht' (tweemaal het normale ademvolume) toegediend vanuit de ventilator. Een pneumotachometer (flow meter) (Ventrak™, Novamatrix, U.S.A.) is aangesloten tussen de tracheotube en de inspiratiearm van de Servo-ventilator. Deze meet een drukverschil tussen het begin van de flowmeter en het einde van de flowmeter. Het gemeten verschil in druk is een maat voor de flow van de lucht door de meter. Een kleiner drukverschil duidt op een snellere flow.

VERNEVELMETHODE

De vernevelaar (Cirrus™ Nebulizer, Intersurgical, Nederland) is geïnstalleerd aan de inspiratiearm van het beademingsapparaat voor de pneumotachometer. De aanbevolen gasflow bedraagt 7 l/min. Er is een filter (Servo duo guard, Maquet, Zweden) geplaatst aan de expiratiearm van het beademingsapparaat om eventueel uitgedemde medicatie te capteren (Afb. 2). Bij het toedienen



*Afbeelding 2.
Schematische opbouw
van het vernevelsysteem.*

van de aerosol wordt het ademvolume verminderd zodat de totale hoeveelheid luchttoevoer constant blijft. Voordat we met de uiteindelijke experimenten konden beginnen, werd de vernevelaar getest. Door een constant volume van 3 ml fysiologische zoutoplossing (0,9% NaCl) vooraf in de vernevelaar te brengen en na vijf minuten vernevelen de overgebleven hoeveelheid fysiologische zoutoplossing te wegen, konden we berekenen dat er bij een flow van 7 l/min een hoeveelheid van $1 \text{ ml} \pm 0,3 \text{ ml}$ verneveld wordt. Hierna zijn de experimenten gestart met oplopende doses (0,16; 0,32; 0,64; 1,25; 2,5 en 5 mg/ml) van methacholine en salbutamol. Om de concentratiereeks te verkrijgen verdunt men de teststof met fysiologische zoutoplossing tot concentraties van 0,16 tot 5 mg/ml. Bij een concentratie van 2,5 mg/ml methacholine was er een duidelijke constrictie van de luchtwegen waarneembaar. Daarom werd voor de vergelijkende studie gekozen om zowel methacholine als salbutamol te doseren aan een concentratie van 2,5 mg/ml. De ‘diepe zucht’ die normaal gegeven wordt om de 100 ademhalingen (zie paragraaf Beademing), wordt uitgezet tijdens het vernevelen om foutieve interpretaties van de resultaten te voorkomen.

Gemeten en berekende parameters

In het anesthesie hondenmodel worden meer dan 50 parameters gemeten en berekend. Om het artikel relatief eenvoudig te houden worden slechts enkele parameters verder beschreven.

PULMONAIRE PARAMETERS

De hoeveelheid arbeid (work in kJ/l) staat voor de moeite (energie) die de ventilator moet doen om een druk op te bouwen waarmee een liter lucht in de longen kan worden gepompt. Deze ontwikkelde druk (Dev P in mmHg) wordt gemeten, voordat de lucht in de longen gaat, met een pneumotachometer. De gemeten weerstand (R_{aw} in mmHg/ml/s) is een belangrijke indicator voor bronchoconstrictie en wordt groter bij een vernauwing van de bovenste luchtwegen (luchtpijp en bronchi). De dynamische compliantie (C_{dyn} in ml/mmHg) wordt berekend op het moment dat er geen flow is en de longen helemaal gevuld zijn met lucht, dus tussen een inademing en uitademing in. De dynamische compliantie is een indicatie voor de rekbaarheid van de longen en de borstkas. C_{dyn} wordt berekend door het volumeverschil en het drukverschil bij het begin van inademen ten opzichte van het begin van uitademen te delen.

CARDIOVASculaire PARAMETERS

Het hartritme (HR in slagen per minuut of beats per minute: b/min) wordt berekend uit het ECG-signaal. Een katheter in de aorta meet de systolische en diastolische bloeddruk en hieruit wordt de gemiddelde bloeddruk (MBP in mmHg) berekend. De contractie- en relaxatiekracht ($LV dp/dt_{max}$ en $LV dp/dt_{min}$, respectievelijk in mmHg/s) worden beide berekend vanuit het linkervent-



trikeldruksignaal, waarbij $LV dp/dt_{max}$ wordt berekend tijdens het oplopen van de druk en $LV dp/dt_{min}$ tijdens het aflopen van het druksignaal.

BLOEDSTALEN EN LONGBIOPTEN

Voordat het experiment start moeten alle signalen en de parameters minstens vijftien minuten stabiel zijn. Elke dosis wordt verneveld gedurende vijf minuten en direct na verneveling wordt een bloedstaal genomen om de plasmaconcentraties te bepalen van de vernevelde stof. Aan het einde van het experiment wordt het dier geëuthanaseerd en worden uit de rechter- en linkerlong drie longbiopten (boven, midden en onder) genomen van $\pm 2 \text{ cm}^3$. In deze biopten wordt de concentratie aan vernevelde stoffen bepaald.

Data-analyse en statistiek

Alle signalen worden opgenomen en berekend door een analysesoftwareprogramma HEM 3.5 (Notocord, Frankrijk) en opgeslagen in een Excel-bestand. De data in dit artikel zijn weergegeven als gemiddelde waarden \pm standaard afwijking van het gemiddelde (SEM). Voor de statistiek is gebruik gemaakt van een Wilcoxon-Mann-Whitney-test in Excel. Hierbij worden de waarden van de groepen met elkaar vergeleken en een p-waarde $\leq 0,05$ wordt beschouwd als statistisch significant verschillend.

Resultaten

NaCl-OPLOSSING (FYSIOLOGISCHE ZOUTOPLOSSING)

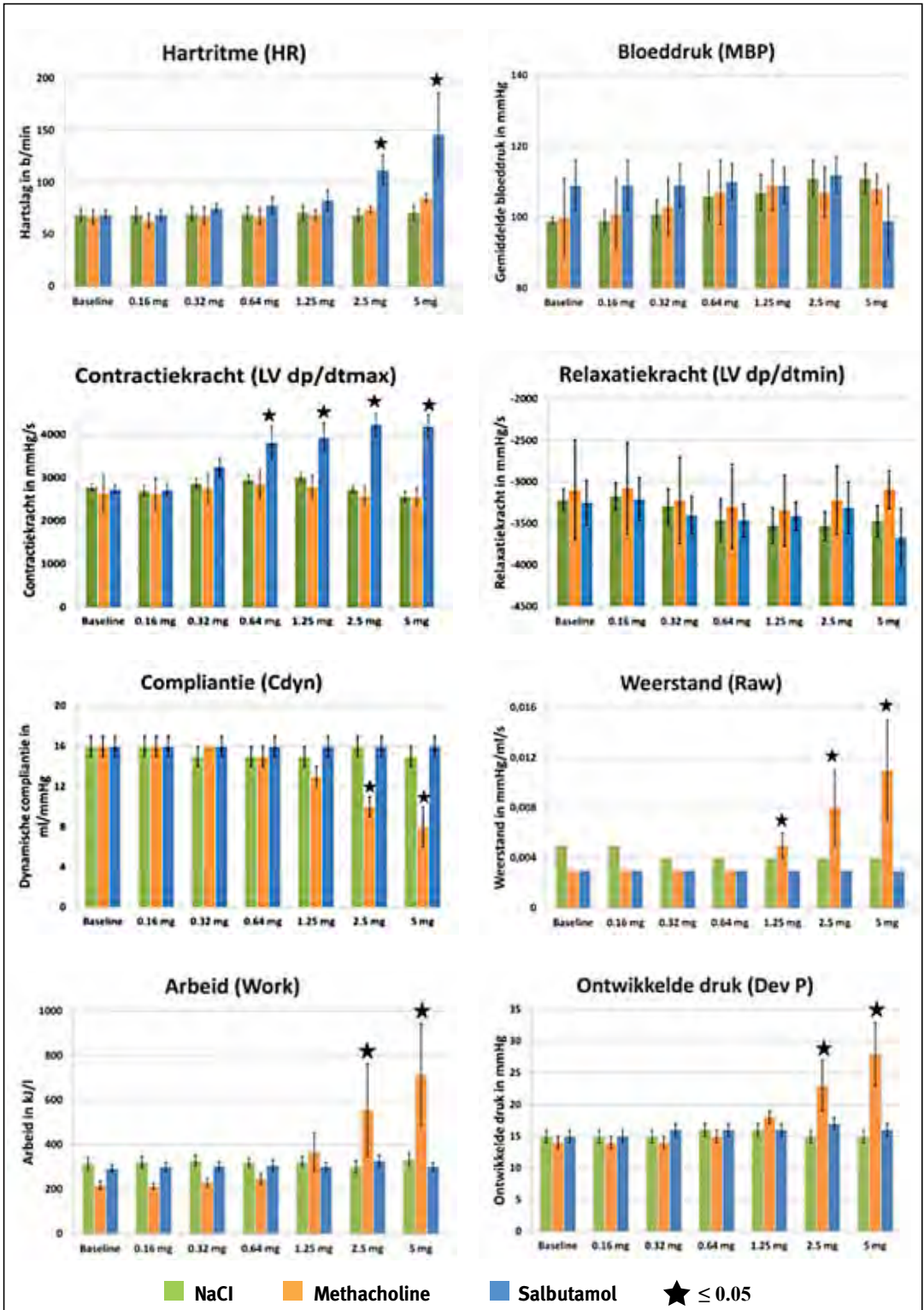
Er zijn vier honden (1 ♂ en 3 ♀; gemiddeld gewicht $11,9 \text{ kg} \pm 1,5 \text{ kg}$), gebruikt in de experimenten voor de verneveling van fysiologische zoutoplossing. Bij verneveling van vijf doses fysiologische zoutoplossing worden zowel op de pulmonaire als de cardiovasculaire parameters geen relevante en/of significante veranderingen waargenomen over een periode van 3 uur (Afb. 3).

OPLOPENDE DOSIS METHACHOLINE

Er zijn vier honden (4 ♂; gemiddeld $12,2 \text{ kg} \pm 1,6 \text{ kg}$) gebruikt voor de verneveling van een oplopende dosis methacholine (Afb. 3). Bij de doseringen van $0,16 \text{ mg/ml}$ tot en met 5 mg/ml worden er geen significante verschillen gezien op de cardiovasculaire parameters. Echter zijn er wel duidelijke verschillen te zien op de pulmonaire parameters. Zo is er op de compliantie een significante daling waargenomen met een maximum tot $8 \pm 2 \text{ ml/mmHg}$ waar de basiswaarde $16 \pm 1 \text{ ml/mmHg}$ bedroeg. Voor de weerstand, ontwikkelde druk en arbeid geldt dat er een stijging plaatsvindt. De weerstand is maximaal gestegen van $0,003 \pm 0,000 \text{ mmHg/ml/s}$ naar $0,011 \pm 0,004 \text{ mmHg/ml/s}$, voor de arbeid is dit $713 \pm 230 \text{ kJ/l}$, hoewel de basiswaarde maar $218 \pm 18 \text{ kJ/l}$ was. De ontwikkelde druk steeg van $14 \pm 1 \text{ mmHg}$ tot een maximum van $28 \pm 5 \text{ mmHg}$. De maximale veranderingen traden telkens op na de dosering van 5 mg/ml . Het tidalvolume, de hoeveelheid in- of uitgeademde lucht in rustfase, vertoont bij geen enkele dosis een significante afwijking. De plasmaconcentraties van methacholine in de bloedstalen en longbiopten lagen onder de detectielimiet van de apparatuur en de stof werd daarom niet teruggevonden in deze biosamples.

OPLOPENDE DOSIS SALBUTAMOL

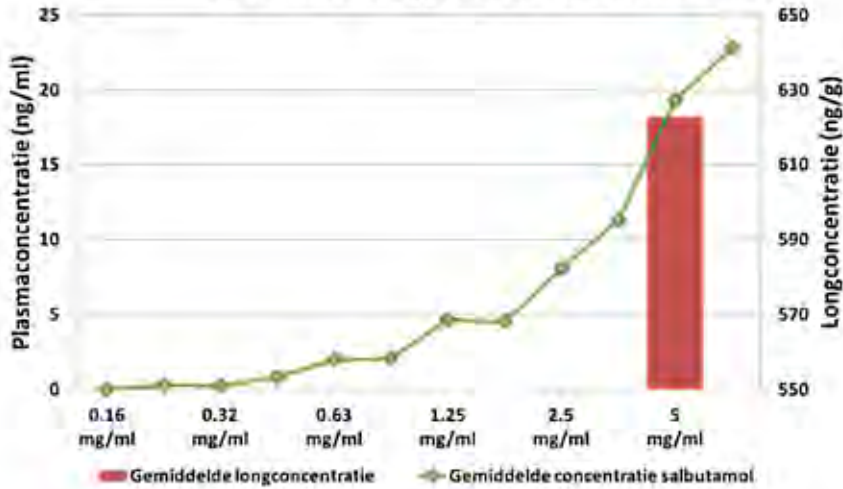
Er zijn vier honden (4 ♂; gemiddeld gewicht $11,8 \text{ kg} \pm 1,8 \text{ kg}$) gebruikt voor de verneveling van een oplopende dosis salbutamol (Afb. 3). Bij de doseringen van $0,16 \text{ mg/ml}$ tot en met 5 mg/ml wordt een maximale significante stijging in hartritme gezien bij 5 mg/ml . Hierbij is het hartritme gestegen van $69 \pm 4 \text{ b/min}$ tot $146 \pm 40 \text{ b/min}$. Ook de contractiekracht geeft een duidelijke stijging van $2739 \pm 102 \text{ mmHg/s}$ tot een maximum van $4189 \pm 266 \text{ mmHg/s}$. De gemiddelde bloeddruk en relaxatiekracht vertonen geen significante afwijkingen. Op de pulmonaire parameters zijn geen significante veranderingen te zien. De plasma- en longconcentraties van salbutamol konden gedetecteerd worden en hierbij ziet men een stijging van de plasmaconcentratie tot een maximum



Afbeelding 3. Gemiddelde veranderingen (\pm SEM) van de cardiovasculaire en pulmonaire parameters na oplopende dosering van NaCl (fysiologisch zout), methacholine en salbutamol.

»

Plasma- en longconcentraties salbutamol



Afbeelding 4. Plasma- en longconcentraties gemeten na olopende doseringen van salbutamol.

van $22,8 \pm 2,6$ mg/ml. De longconcentraties lagen vele malen hoger met een gemiddelde waarde van 623 ± 199 ng/g (Afb. 4).

COMBINATIE AEROSOL SALBUTAMOL MET METHACHOLINE

Tot slot is er nog een vergelijkende studie uitgevoerd tussen vier honden (4 ♂; gemiddeld gewicht $10,1 \text{ kg} \pm 1,2 \text{ kg}$) die eenmaal gedoseerd zijn met methacholine 2,5 mg/ml en vier honden (4 ♂; gemiddeld gewicht $9,3 \pm 0,4 \text{ kg}$) die eenmaal gedoseerd zijn met een combinatie van salbutamol 2,5 mg/ml en methacholine 2,5 mg/ml. Bij deze studie is duidelijk naar voren gekomen dat salbutamol in combinatie met methacholine, een kleiner effect heeft op de pulmonaire parameters (Tabel 1). Dit is een indicatie dat salbutamol de werking van methacholine remt. Bij de cardiovasculaire parameters ziet men een duidelijk effect van de combinatie van salbutamol met methacholine, in vergelijking met methacholine alleen (Tabel 1).

Max Δ% effecten cardiovasculaire parameters

	HR		MBP		LV dp/dt _{max}		LV dp/dt _{min}	
	Basis	Δ%	Basis	Δ%	Basis	Δ%	Basis	Δ%
Methacholine	78	-1	103	3	3144	1	-3408	0
Methacholine + Salbutamol	76	58	95	-13	3045	11	-3350	-12

Max Δ% effecten pulmonaire parameters

	Cdyn		Raw		Work		Dev P	
	Basis	Δ%	Basis	Δ%	Basis	Δ%	Basis	Δ%
Methacholine	17,8	-13	0,0011	50	159	33	15,2	11
Methacholine + Salbutamol	17	-3	0,0012	0	154	12	14,7	3

Tabel 1. Basiswaarden en de maximale procentuele effecten van verschillende pulmonaire en cardiovasculaire parameters in een vergelijkende studie van methacholine vs. methacholine + salbutamol. Met dikgedrukt en cursief de statistische significantie ($p \leq 0,05$).

DE OPSTELLING

Als we de beginwaarden voor verneveling van de cardiovasculaire parameters bekijken, blijken deze goed vergelijkbaar te zijn met de literatuurgegevens voor de wakkere hond (4). Ook wat de pulmonaire parameters betreft, komen we met onze resultaten van de weerstand en compliantie dicht overeen met de basiswaarden van wakkere honden (5). Uit de experimenten met verneveling van fysiologische zoutoplossing is gebleken dat de dieren minstens 3 uur stabiel blijven.

Een verlaagde compliantie wordt gezien bij ernstige longaandoeningen zoals bijvoorbeeld ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) en pneumonie en dit verwachten wij dus ook bij verneveling van methacholine. Uit een ander onderzoek is gebleken dat het volume dat in- of uitgeademd wordt daalt als reactie op methacholine (6). Er wordt dus verwacht dat als gevolg van methacholineverneveling in de geanestheerde hond de compliantie afneemt en dat de weerstand, de ontwikkelde druk en de arbeid van de longen zullen toenemen. Bij de olopende doseringen van methacholine worden deze effecten dan ook daadwerkelijk gezien als gevolg van een constrictie in de luchtwegen. Dit wordt mede bevestigd door een voorgaand aerosolonderzoek bij wakkere honden (6). Verder zien we geen effecten van methacholine op de cardiovasculaire parameters. Van salbutamol wordt verwacht dat verneveling hiervan een vergroting van de compliantie geeft en dat de weerstand, de ontwikkelde druk en de arbeid van de longen zullen afnemen.

Tijdens onze reeks van vernevelingen met toenemende concentratie aan salbutamol worden geen significante veranderingen waargenomen op de pulmonaire parameters. Waarschijnlijk is dit te verklaren omdat de longen van de honden volledig gerelaxeerd zijn door het gebruik van fentanyl in het model en zodoende de mogelijke relaxerende werking van salbutamol gemaskeerd wordt. Ook het feit dat de honden geïntubeerd zijn kan wel degelijk een rol spelen, omdat de diameter van de tracheotube een bepaalde weerstand heeft die niet verandert bij dosering van salbutamol. Hier tegenover staat dat methacholine nog wel een effect kan uitoefenen op de weerstand, omdat de trachea nog wel constrictie kan vertonen en een kleinere diameter kan hebben dan de tracheatube vanaf het punt waar deze stopt. Uit de literatuur blijkt dat intratracheale toediening van salbutamol een stijging geeft in compliantie bij de geanestheerde hond na provocatie met methacholine (7). De resultaten van onze studie met een combinatie van methacholine en salbutamol bevestigen dit. Zo zagen we ook een verlaging in de weerstand, ontwikkelde druk en de arbeid vergeleken met de doseringen die enkel methacholine bevatten. In onze studie toonden we aan dat verneveling van salbutamol het hartritme verhoogt bij een dosis van 2,5 mg/ml en hoger. In een vroegere studie werd ook een stijging van het hartritme gezien na een vergelijkbare intratracheale dosis van salbutamol (7). Er werd geen stijging van het hartritme gezien na verneveling van salbutamol bij astmatische patiënten, maar de toegepaste dosis in patiënten is doorgaans lager dan hier toegepast (i.e. 100 tot 200 µg in patiënten) (2,8). Wel is er bij deze astmatische patiënten na iv-toediening van salbutamol een stijging in het hartritme te zien.

In de longbiopten werden veel hogere concentraties aan salbutamol gevonden dan in de plasmastalen. Ook werd duidelijk dat de concentraties tussen de twee bloedstalen van eenzelfde dosis sterk afnamen in verloop van de tijd. Methacholine is een instabiel molecuul waardoor deze niet meer was waar te nemen in de bloedstalen en longbiopten tegen de tijd dat ze geanalyseerd werden.

STUDIEBEPERKINGEN

Doordat de honden continu worden beademd met een ventilator die een vast volume aan eenzelfde frequentie blaast zijn eventuele veranderingen van deze parameters (ademhalingsvolume en -frequentie) niet mogelijk en is het model enkel geschikt voor het detecteren van drukgerelateerde parameters, zoals longweerstand, dynamische compliantie, longarbeid en de ontwikkelde druk in de longen. De in het diermodel toegepaste anesthesie en spierverslappers kunnen (deels) al voor bronchodilatatie zorgen, waardoor directe effecten van salbutamol (of andere verwijdende medicijnen) mogelijk gemaskeerd worden. Het lijkt daarom aangewezen om stoffen waarbij een dergelijk »

effect verwacht wordt in combinatie te geven met een bronchoconstrictor (zoals voor methacholine bij salbutamol). Hoewel de gemeten blootstellingen voldoende hoog waren, kan er niet helemaal worden uitgesloten dat een deel van de medicatie verloren is gegaan in het luchtcircuit van de ventilator en de tracheotube.

Mogelijk had de toevoeging van b.v. een cholinesteraseremmer aan de bloed- en weefselstalen de detecteerbaarheid van methacholine in dit medium verbeterd.

Conclusie

Hoewel de anesthesie de resultaten enigszins kan hebben beïnvloed, kunnen we stellen dat de hier besproken methode voor verneveling van geneesmiddelen in de luchtwegen een praktisch goed bruikbaar model is en dat de verwachte effecten, maar ook bijwerkingen op de longfunctie en het cardiovasculaire systeem, werden bevestigd. Alle benodigde parameters waren goed te meten met de beschikbare apparatuur. Dit model kan een basis vormen voor toekomstig cardiovasculair veiligheidsonderzoek naar geneesmiddelen die via verneveling toegediend zullen worden.

Literatuurlijst

1. Cullum VA, Farmer JB, Jack D, Levy GP (1969). Salbutamol: a new, selective β -adrenoceptive receptor stimulant. *British Journal of Pharmacology* 35: 141-151.
2. Hetzel MR, Clark TJH (1976). Comparison of intravenous and aerosol salbutamol. *British Medical Journal* 919 (abstract).
3. Van Der Linde HJ, Van Deuren B, Somers Y, Teisman A, Gallacher DJ (2011). The Fentanyl/Etomidate-Anesthetized Beagle (FEAB) Model in Safety Pharmacology Assessment. *Current Protocols in Pharmacology* 54: 10.13.1-10.13.21.
4. Van Deuren B, Van Ammel K, Somers Y, Cools F, Straetemans R, Van der Linde HJ, Gallacher DJ (2009). The fentanyl/etomidate-anaesthetised beagle (FEAB) dog: A versatile in vivo model in Cardiovascular Safety Research. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 60: 11-23.
5. Rozanski EA, Greenfield CL, Alsup JC, McKiernan BC, Hungerford LL (1994). Measurement of upper airway resistance in awake untrained dolichocephalic and mesocephalic dogs. *American Journal of Veterinary Research* 55: 1055-9.
6. Warner DO, Gunst UJ (1992). Limitation of maximal bronchoconstriction in living dogs. *American review Respiratory Diseases* 145: 553-560.
7. Casthely PA, Cottrell JE, Urquhart PA (1985). Comparison of metaproterenol, isoetharine and salbutamol in the relief of methacholine-induced bronchospasm in dogs. *Canadian Anaesthetists' Society Journal* 32: 112-8.
8. Neville A, Palmer JBD, Gaddie J, May CS, Palmer KNV, Murchison LE (1977). Metabolic effects of salbutamol: comparison of aerosol and intravenous administration. *British Medical Journal* 1: 413-414.

