

Université de Montréal

**Gradient artérioveineux et concentrations interstitielles des
bloqueurs neuromusculaires au niveau du muscle: impact sur la
modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique**

par

Samia Ezzine

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor
en sciences pharmaceutiques
(option pharmacologie)

Novembre 2004

© Samia Ezzine, 2004



QV

705

U58

2005

v.001

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Gradient artérioveineux et concentrations interstitielles des
bloqueurs neuromusculaires au niveau du muscle: impact sur la
modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique**

présentée par :
Samia Ezzine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Julie Ducharme, président-rapporteur
Dr. France Varin, directeur de recherche
Dr. François Donati, co-directeur
Dr. François Girard, membre du jury
Dr. Pierre-Maxime Bélanger, examinateur externe

RÉSUMÉ

Certains bloqueurs neuromusculaires (BNM) tels que l'atracurium, le cisatracurium et le mivacurium subissent une élimination indépendante des organes telle qu'une hydrolyse chimique ou enzymatique. Étant donné la distribution tissulaire des enzymes, et le fait que l'hydrolyse chimique soit dépendante du pH et de la température corporelle, il est possible que la dégradation de telles molécules puisse avoir lieu aussi bien dans le plasma que les tissus périphériques.

En se basant sur des études cliniques, nous avons constaté que le mivacurium avait un très faible volume apparent de distribution (équivalent tout au plus au volume vasculaire) lorsqu'on utilisait un modèle pharmacocinétique traditionnel, sans inclure une constante d'élimination au niveau du compartiment périphérique. Cette sous-estimation du volume de distribution indiquait qu'un modèle avec élimination centrale était inadéquat. Par conséquent, nous avons énoncé l'hypothèse que le mivacurium est hydrolysé dans les tissus périphériques et nous avons entrepris l'évaluation du gradient artério-veineux à l'état d'équilibre chez le patient anesthésié.

Lors d'une perfusion intraveineuse continue chez 7 patients anesthésiés, nous avons démontré la présence d'un gradient artérioveineux (variant entre 34% et 42%) au niveau de l'avant-bras pour les isomères actifs du mivacurium (*cis trans* et *trans trans*). Ces résultats démontrent que le choix du site de prélèvement sanguin, artériel ou veineux serait crucial pour caractériser la relation concentration-effet du mivacurium.

À la lumière de ces résultats et sachant que le mivacurium est un ammonium quaternaire distribué exclusivement dans le liquide interstitiel, nous avons émis notre deuxième hypothèse: le mivacurium est hydrolysé dans le liquide interstitiel du muscle, représentant la biophase. Pour le démontrer, nous avons décidé de quantifier la concentration du mivacurium dans le liquide interstitiel par microdialyse. Cette information s'avérerait d'une importance inestimable d'une part, pour proposer un facteur de correction pour les concentrations effet dans la biophase, et d'autre part, pour valider les modèles pharmacocinétiques paramétriques.

La microdialyse, une technique donnant accès à la biophase, permettrait la quantification des concentrations interstitielles du mivacurium. Dans un premier temps, nous devons valider cette technique chez un modèle animal en utilisant un BNM dont l'élimination corporelle dépend exclusivement des organes (contrôle négatif). Nous avons choisi le rocuronium puisqu'il est distribué dans le liquide extracellulaire et éliminé par excrétion biliaire et rénale. La validation de la technique de microdialyse consistait à mesurer les concentrations interstitielles du rocuronium à l'état d'équilibre chez 8 chiens anesthésiés. En démontrant qu'à l'état d'équilibre, les concentrations interstitielles de rocuronium étaient similaires aux concentrations veineuses libres, nous avons conclu que la technique de microdialyse était fiable et exacte lorsque la méthode de calibration de la sonde est adéquate.

En caractérisant la relation concentration-effet du rocuronium et en se servant des données de microdialyse, nous avons confirmé expérimentalement la légitimité des hypothèses émises lors de la modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique pour la prédiction des concentrations dans le compartiment périphérique ou le compartiment effet. Nos travaux ont également permis de démontrer, pour la première fois, que le rocuronium s'accumule fortement dans le muscle, et ce, probablement par une liaison non spécifique aux protéines tissulaires.

Finalement, nous avons appliqué la technique de microdialyse pour quantifier les concentrations interstitielles du mivacurium chez 7 chiens anesthésiés. Contrairement aux résultats observés chez l'homme, les demi-vies d'élimination des isomères actifs du mivacurium se sont avérées 30 fois plus longues chez le chien. De plus, les métabolites monoester et alcool issus de la dégradation enzymatique du mivacurium par la cholinestérase plasmaticque n'étaient pas formés *in vivo* ou après incubation *in vitro*. L'absence d'extraction musculaire pour le mivacurium chez le chien en dépit d'une activité normale de la cholinestérase plasmaticque souligne l'importance d'effectuer des études *in vivo*. Nos résultats indiquent que la butyrylcholine n'est pas un substrat adéquat pour représenter la vitesse d'hydrolyse plasmaticque du mivacurium *in vitro* mais également *in vivo*. Ce constat remet en question la valeur prédictive des extrapolations *in vitro* - *in vivo*, et ce, pour une même espèce.

Nous avons toutefois été capables de caractériser la relation concentration-effet du mivacurium chez le chien pour la première fois. Nos résultats ont démontré, qu'à part une sensibilité accrue, le temps d'équilibre entre le plasma et le site d'action est semblable à celui dérivé chez l'homme.

Mots-clés: mivacurium, hydrolyse musculaire, gradient artérioveineux, microdialyse, rocuronium, pharmacocinétique, pharmacodynamie

ABSTRACT

Some neuromuscular blocking agents (NMBAs) are rapidly eliminated in the bloodstream by organ independent pathways such as enzymatic or chemical hydrolysis. These drugs may undergo elimination in the peripheral tissues as well. Mivacurium is a mixture of three stereoisomers, two of which are known to be pharmacologically active and rapidly broken down by plasma cholinesterase (butyrylcholinesterase).

Based on previous clinical studies, mivacurium had a small volume of distribution when using traditional compartmental pharmacokinetic model including elimination from central compartment only. The underestimation of the volume of distribution indicates that pharmacokinetic model was inadequate for mivacurium. Accordingly, we hypothesized that mivacurium may undergo elimination in the peripheral tissues as well.

The purpose of our first study was to investigate if mivacurium undergoes peripheral elimination in muscle tissue. The arteriovenous gradient was measured in the forearm under steady state conditions in 7 anesthetized patients undergoing elective surgery. Our study revealed a significant extraction of the two active isomers of mivacurium (*cis trans* and *trans trans*) during their transit through the microcirculation of the forearm. These results prove that the choice of the sampling site (arterial or venous) have significant impact in studies designed to characterize the concentration-effect relation of such drugs.

According to our results and in view of the extracellular distribution of mivacurium, it would be reasonable to infer that mivacurium may be hydrolyzed in the interstitial fluid of the muscle tissue, representing the biophase. Indeed, direct measurement of interstitial concentrations of mivacurium would be invaluable since it would offer experimental evidence in support of the choice of the sampling site.

Microdialysis, an *in vivo* sampling technique, provides a unique tool to evaluate interstitial drug concentrations in the muscle tissue. The issue of probe calibration is a

critical requirement for quantitative determination of drug concentration in tissue interstitial fluid. The purpose of our second study was to develop and validate a microdialysis technique in the muscle tissue of anesthetized dogs using rocuronium, a NMBA exclusively distributed in the extracellular fluid and eliminated mainly by biliary and renal excretion. We demonstrated that, under steady state conditions, unbound rocuronium concentrations are similar in muscle interstitial fluid and venous plasma when microdialysis probe is properly calibrated. These results prove that microdialysis is an accurate and reliable *in vivo* calibration technique.

When characterizing the concentration-effect relation of rocuronium in these dogs, we found that rocuronium unbound concentrations measured in the muscle interstitial fluid under steady state conditions confirm that parametric PK-PD modeling gives reliable estimates of effect site concentrations. This is also the first study reporting a significant accumulation of rocuronium in the muscle tissue, probably by non specific protein binding.

The objective of the last study was to quantify tissue extraction of mivacurium under steady state conditions in anesthetized dogs using microdialysis. By doing so, we revealed that the active isomers of mivacurium are eliminated at a slower rate compared to humans (30-fold). In addition, the absence of metabolites either *in vivo* or *in vitro* suggested that mivacurium is not metabolized by plasma cholinesterase in dogs. The absence of tissue hydrolysis of mivacurium in dogs despite a high plasma cholinesterase activity reveals the importance of conducting *in vivo* studies. Indeed, butyrylcholine seems to be inadequate to evaluate the rate of mivacurium hydrolysis *in vitro* and *in vivo*. Based on these findings, the validity of extrapolations from *in vitro* to *in vivo* data remains questionable even in the same specie.

In doing this study, we were able to characterize, for the first time, the concentration-effect relation of mivacurium in dogs. Despite a greater sensitivity to mivacurium, the pharmacokinetic-pharmacodynamic behavior of mivacurium in dogs was comparable to that observed in humans.

Keywords: mivacurium, muscle extraction, arteriovenous gradient, microdialysis, rocuronium, pharmacokinetic, pharmacodynamics

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de recherche, Dr France Varin, de m'avoir savamment guidée, et d'avoir instauré un climat de cordialité et de compréhension afin de mener à bien ce travail.

Je désire remercier Dr François Donati pour sa disponibilité et ses conseils scientifiques pertinents.

Dr Nobuharu Yamaguchi a toute ma gratitude pour le soutien et la générosité dont il a fait preuve.

Je tiens à remercier Mesdames Johanne Couture et Sanae Yamaguchi de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences techniques et de leur savoir-faire. J'ai eu le grand plaisir de travailler avec Johanne Couture, une personne pleine d'énergie et d'enthousiasme.

Je désire vivement remercier mes collègues et amies de laboratoires, Julie Roy et Miriam Kabbaj pour leur soutien moral et leur amabilité. C'était stimulant d'avoir partagé avec elles des discussions scientifiques pertinentes tout au long de ces années.

Je suis reconnaissante envers le CIHR-R&D pour son appui financier tout au long de mes études de Doctorat.

Je ne peux m'empêcher d'exprimer toute ma gratitude à mes parents, spécialement à ma mère, qui venue de loin, n'a pas cessé de me supporter afin de mener à terme ce travail.

Dans ma mémoire restera éternellement gravée l'image du soutien permanent et de l'encouragement continu de mon conjoint et père de mes enfants, Mounir.

Il ne faut surtout pas oublier de remercier mes deux trésors, Sarah et Salma, qui sans le plaisir quotidien qu'elles me procurent, je n'aurai jamais regagné assez d'énergie pour me permettre de passer à travers la plus longue et épuisante épreuve de ma vie.

*A Sarah, Salma et Mounir, pour les liens
profonds qui nous unissent...*

TABLE DES MATIÈRES

1	Revue de littérature	2
1.1	Généralités.....	2
1.1.1	Historique	2
1.1.2	Utilisation clinique des curares	2
1.2	Transmission neuromusculaire	3
1.2.1	Jonction neuromusculaire	3
1.2.2	Synthèse et mise en réserve de l'acétylcholine	5
1.2.3	Mobilisation des vésicules synaptiques et libération du neurotransmetteur ..	5
1.2.4	Les récepteurs cholinergiques nicotiniques	7
1.2.4.1	Récepteurs postjonctionnels.....	7
1.2.4.2	Récepteurs préjonctionnels	9
1.3	Monitoring de la fonction neuromusculaire	9
1.3.1	Principe de la stimulation nerveuse périphérique.....	10
1.3.2	Modes de stimulation nerveuse.....	10
1.3.2.1	Stimulation simple ou isolée.....	10
1.3.2.2	Stimulation en train-de-quatre	10
1.3.2.3	Stimulation tétanique.....	11
1.3.3	Sites de la stimulation nerveuse et réponse des différents muscles	11
1.4	Pharmacologie des bloqueurs neuromusculaires	12
1.4.1	Relations structure-activité	12
1.4.2	BNM dépolarisants	15
1.4.3	BNM non-dépolarisants.....	16
1.4.4	Rocuronium	18
1.4.4.1	Propriétés pharmacocinétiques	18
1.4.4.2	Propriétés pharmacodynamiques	20
1.4.5	Mivacurium	21
1.4.5.1	Propriétés pharmacocinétiques	21
1.4.5.2	Propriétés pharmacodynamiques	23
1.4.5.3	Cholinestérase plasmatique.....	25
1.5	Modélisation Pharmacocinétique et pharmaco-dynamique.....	27
1.5.1	Objectifs	27

1.5.2 Modèles pharmacocinétiques compartimentaux	28
1.5.2.1 Définition.....	28
1.5.2.2 Modèle compartimental avec élimination centrale : Application aux BNM	28
1.5.2.3 Modèle compartimental avec élimination centrale et périphérique : Application aux BNM	29
1.5.3 Modèles pharmacodynamiques	31
1.6 Modèles Pharmacocinétiques-pharmacodynamiques (PK/PD)	32
1.6.1 objectifs	32
1.6.2 Approche paramétrique	34
1.6.3 Approche semi-paramétrique	35
1.6.4 Approche non paramétrique	36
1.7 Quantification des xénobiotiques dans la biophase: Application aux BNM.....	36
1.7.1 Distribution des médicaments dans le liquide interstitiel	36
1.7.1.1 Rappel physiologique	37
1.7.1.2 Échanges transcapillaires.....	42
1.7.1.3 Mécanisme de diffusion tissulaire.....	44
1.7.1.4 Facteurs influençant les échanges transcapillaires.....	44
1.7.2 Technique de microdialyse	46
1.7.2.1 Principe de microdialyse	47
1.7.2.2 Paramètres expérimentaux affectant la détermination de la concentration des xénobiotiques.....	48
1.7.2.3 Calibration <i>in vitro</i>	50
1.7.2.4 Méthode d'extrapolation	50
1.7.2.5 Limites de la calibration <i>in vitro</i>	51
1.7.2.6 Calibration <i>in vivo</i>	51
1.7.2.7 Aspect analytique	54
1.7.2.8 Avantages	54
1.7.2.9 Inconvénients	55
1.7.3 Applications de la microdialyse dans les tissus périphériques.....	55
1.7.3.1 Applications cliniques de la microdialyse.....	56
2 Récapitulatif et objectifs	58
3 Publications.....	60

3.1 Mivacurium Arteriovenous Gradient During Steady State Infusion in Anesthetized Patients.....	61
3.2 Determination of Interstitial Rocuronium Concentrations in the Muscle tissue of Anesthetized Dogs by Microdialysis	85
3.3 Interstitial Muscle Concentrations of rocuronium under Steady state Conditions in Anesthetized dogs: Actual versus Predicted Values	115
3.4 Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relation of Mivacurium in Anesthetized Dogs	145
4 Discussion générale.....	170
4.1 Gradient artérioveineux du mivacurium chez le patient anesthésié	170
4.2 Détermination des concentrations interstitielles du rocuronium par microdialyse chez le chien anesthésié	172
4.3 Concentrations du rocuronium dans le liquide interstitiel chez le chien à l'état d'équilibre: Valeurs expérimentales versus valeurs prédites	174
4.4 Détermination des concentrations interstitielles du mivacurium par microdialyse chez le chien anesthésié	176
5 Perspectives d'avenir.....	179
6 Références	180

Liste des tableaux

Article 1:

Table I: Steady State Pharmacokinetic Parameters for Mivacurium Isomers.....81

Table II: Arteriovenous Plasma Concentrations for Mivacurium Metabolites.....82

Article 2:

Table I: Interstitial Rocuronium Concentrations versus Unbound Plasma Concentrations at Steady State using Standard Retrodialysis.....110

Table II: Interstitial Rocuronium Concentrations versus Unbound Plasma Concentrations at Steady State using Combined Retrodialysis.....111

Article 3:

Table I: Physiological Parameters, Protein Binding and Arteriovenous Gradient in Dogs under Continuous Infusion of Rocuronium.....132

Table II: Rocuronium Pharmacokinetic Parameters in Anesthetized Dogs.....133

Table III: Rocuronium Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs.....135

Table IV: Rocuronium Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Parameters in Pentobarbital Anesthetized Dogs.....136

Table V: Steady State Rocuronium Concentrations in Pentobarbital Anesthetized Dogs.....137

Table VI: Rocuronium Concentrations at Terminal Sampling Point in Pentobarbital Anesthetized Dogs.....138

Article 4:

Table I: Mivacurium Administered Doses in Anesthetized Dogs.....161

Table II: Physiological Parameters on Anesthetized Dogs.....162

Table III: Mivacurium Pharmacokinetic Parameters in Anesthetized Dogs.....163

Table IV: Mivacurium Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs.....164

Table V: Mivacurium Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs.....165

Liste des figures

Figure 1: Transmission neuromusculaire normale	4
Figure 2: Processus de transmission neuromusculaire: synthèse et mise en réserve de l'acétylcholine, mobilisation des vésicules synaptiques et libération du neurotransmetteur .	6
Figure 3: Récepteur cholinergique nicotinique	8
Figure 4: Structure chimique des bloqueurs neuromusculaires stéroïdiens	17
Figure 5: Structure chimique des bloqueurs neuromusculaires benzyloquinolines	18
Figure 6: Activité enzymatique et spécificité de substrat des pseudochoolinésterases chez différentes espèces	27
Figure 7: Représentation schématique d'un modèle pharmacocinétique linéaire classique à deux compartiments..	29
Figure 8: Représentation schématique d'un modèle pharmacocinétique linéaire à deux compartiments avec élimination des compartiments central et périphérique.....	30
Figure 9: Modèle de lien PK/PD	33
Figure 10: Différents types de capillaires.....	40
Figure 11: Différents mécanismes d'échanges transcapillaires.....	43
Figure 12: Schéma d'une sonde de microdialyse du type concentrique.....	47

Article I:

Figure 1: Steady State Arterial Concentrations for <i>Cis Trans</i> (—), <i>Trans Trans</i> (- -) and <i>Cis Cis</i> Mivacurium (...) at Different Collection Times in Each Patient. Infusion Rates were 3 (Patient 1), 5 (Patients 2, 4, 7, 8) and 7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Patients 3, 5, 6).....	83
Figure 2: Mean Arterial and Venous Steady State Concentrations for (A) <i>Trans Trans</i> , (B) <i>Cis Trans</i> and (C) <i>Cis Cis</i> Mivacurium in Eight Anesthetized Patients.....	84

Article II:

Figure 1: Chemical Structures of Rocuronium and Vecuronium.....	112
Figure 2: Schematic Representation of Experimental Protocols using (A) Standard Retrodialysis and (B) Combined Retrodialysis as the <i>in vivo</i> Experimental Protocol in Anesthetized Dogs.....	113
Figure 3: (A) Effect of Perfusion Flow Rates and (B) Rocuronium Concentrations on the <i>in vitro</i> Recovery of Rocuronium (●) and Loss of Vecuronium (○) From the Microdialysis Probe. Data are presented as mean \pm SD, ($n = 4$).....	114

Article III:

Figure 1: (A) Individual Rocuronium Plasma Concentration-versus-Time Curves (B) Individual Neuromuscular Effect of Rocuronium in Individual Dogs.....	140
Figure 2: (A) Observed versus Predicted Rocuronium Plasma concentrations, Predicted Peripheral and Effect Compartment Concentrations and Interstitial Tissue Concentrations in Dog 5 (B) Observed versus Predicted Neuromuscular Effect of Rocuronium in Dog 5.....	141

Article IV:

Figure 1: Observed versus Predicted Mivacurium Plasma Concentrations in Anesthetized Dogs.....	166
--	-----

Liste des sigles et des abréviations

Å	Angstrom où $1\text{Å} = 0.1\text{ nm}$
φ	Diamètre
A	Surface d'échange capillaire
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADME	Absorption, distribution, métabolisme, élimination
AIC	Critère d'Akaike
AUC	Aire sous la courbe
BNM	Bloqueur neuromusculaire
C _e	Concentration dans la compartiment effet (biophase)
C _{ECF}	Concentration dans le liquide extracellulaire
ChAT	Acétyltransférase
C _{in}	Concentration dans le perfusat
CL	Clairance
C _r	Concentration dans le réservoir

C_{out}	Concentration dans le dialysat
C_p	Concentration plasmatique
D	Coefficient de diffusion
DBS	Stimulation en salve double
DN	Dibucaine number
DF	Fluoride number
ΔC	Différence de concentration
ΔX	Distance de diffusion
E	Effet pharmacologique
E_0	Effet en absence du principe actif
ECF	Liquide extracellulaire
E_{max}	Effet maximal
EC_{50}	Concentration qui produit 50% de l'effet maximal
ED_{90}	Dose requise pour avoir 90% de l'effet
ED_{95}	Dose requise pour avoir 95% de l'effet
ISF	Liquide interstitiel

J_s	Vitesse de diffusion
K_{10}	Constante de transfert de premier ordre hors du compartiment central (compartiment 1)
K_{12}	Constante de transfert de premier ordre du compartiment 1 vers le compartiment 2
K_{21}	Constante de transfert de premier ordre du compartiment 2 vers le compartiment 1
K_{20}	Constante de transfert de premier ordre hors du compartiment périphérique (compartiment 2)
$K_{in\ vitro}$	Constante d'élimination obtenue après incubation in vitro
K_{e0}	Constante de transfert du premier ordre hors du compartiment effet
K_{1e}	Constante de transfert du premier ordre du compartiment central au compartiment effet
MRT	Temps de transit moyen dans l'organisme
nAChR	Récepteur cholinergique nicotinique
PAM	Potentiel de plaque miniature
PK	Pharmacocinétique
PD	Pharmacodynamie
PK-PD	Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique ou relation concentration-effet

PS	Perméabilité de surface
PTC	Décompte post-tétanique
Q	Débit sanguin
RR (%)	Rendement relatif
$R_{in vivo}$	Rendement <i>in vivo</i>
TdQ	Train-de-quatre
$T_{1/2}$	Temps de demi-vie
VAcHT	"Vesicular Acetylcholine Transporters"
Vd	Volume de distribution
V_e	Volume de distribution du compartiment effet
Vdss	Volume de distribution à l'équilibre
Xe	Quantité dans le compartiment effet

1 Revue de littérature

1.1 Généralités

1.1.1 Historique

Très connu et utilisé comme poison de chasse ou dans les romans policiers, le curare est depuis longtemps un médicament dont l'anesthésiste et le chirurgien n'imaginent pas devoir se passer. «Voici, quelques milliers d'années, un jeune chasseur des bords de l'Orénoque aperçut un faucon griffant l'écorce d'une liane afin d'enduire ses serres de sa sève, avant de se précipiter sur sa proie qui tomba foudroyée à ce seul contact. L'idée lui vint d'enduire les dards de sa sarbacane de cette "arme" stupéfiante.»¹ Ce produit, qui tire son nom de la liane (ourari) dont il est extrait, fut rapporté de Guyane au 16e siècle par un explorateur anglais, Walter Raleigh. Il resta pendant deux siècles l'objet de craintes et de récits picaresques.¹

En 1828, la synthèse de la "curarine", vingt fois plus toxique que le produit d'origine, permit les premières expérimentations animales, lesquelles débouchèrent sur la découverte, par Claude Bernard, de son mécanisme d'action au niveau de la jonction neuromusculaire également appelée plaque motrice.²

Ce n'est qu'en 1942 que fut isolée la d-tubocurarine,³ qui après avoir été utilisée en psychiatrie pour réduire fractures et luxations des malades convulsifs, fut proposée à Griffith qui s'en servit comme adjuvant de l'anesthésie générale. La spectaculaire efficacité de ce produit dopa la recherche qui mit au point une nouvelle molécule curarisante, la gallamine.⁴

1.1.2 Utilisation clinique des curares

La curarisation n'a aucun intérêt en elle-même. Elle se justifie par la facilité qu'elle apporte à la réalisation de certains actes chirurgicaux ou anesthésiques et dans certaines situations de réanimation. La chirurgie, notamment abdominale et thoracique, bénéficie des curares en ce sens que le relâchement musculaire que ces derniers induisent permet au praticien de travailler confortablement et évite le recours

à une anesthésie trop profonde, laquelle introduit un stress physiologique particulièrement au niveau du système circulatoire.⁵

La curarisation est justifiée lors d'anesthésies utilisant des drogues déprimant la fonction ventilatoire afin de permettre une intubation endo-trachéale non traumatique. Celle-ci permet de protéger les voies respiratoires contre l'aspiration du contenu gastrique et assurer une ventilation artificielle pour le patient.

En réanimation, les curares sont utilisés de façon ponctuelle pour la réalisation d'actes courts, mais aussi de façon prolongée quand l'immobilisation du patient est requise en raison du matériel utilisé pour sa réanimation (intubation fragile, circulation extra-corporelle, ballon de contre pulsion intra-aortique) ou quand la pathologie le requiert (syndrome de détresse respiratoire aiguë, hypertension intracrânienne, rigidité musculaire).

1.2 Transmission neuromusculaire

1.2.1 Jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est spécialisée à la fois sur les plans nerveux et musculaire dans la transmission et la réception des messages chimiques. Chaque motoneurone se prolonge sans interruption de la corne ventrale de la moelle épinière jusqu'à la jonction neuromusculaire par un long axone myélinisé. La terminaison nerveuse du nerf est très différente du reste du neurone puisqu'elle est recouverte d'une cellule de Schwann et n'est pas myélinisée.

Bien que Claude Bernard ait introduit le concept de la jonction neuromusculaire il y a 150 ans, la connaissance détaillée du mécanisme de la transmission neuromusculaire n'a commencé qu'au milieu des années 60 avec l'observation de petits potentiels dépolarisants spontanés aux jonctions neuromusculaires. De manière générale, la propagation d'un potentiel d'action de l'axone à la terminaison nerveuse permet la diffusion de l'ion calcium provoquant la libération d'un neuromédiateur, l'acétylcholine (ACh). Ce dernier diffuse à travers l'espace jonctionnel et réagit avec des récepteurs de la plaque motrice pour initier la contraction musculaire (Figure 1).⁶

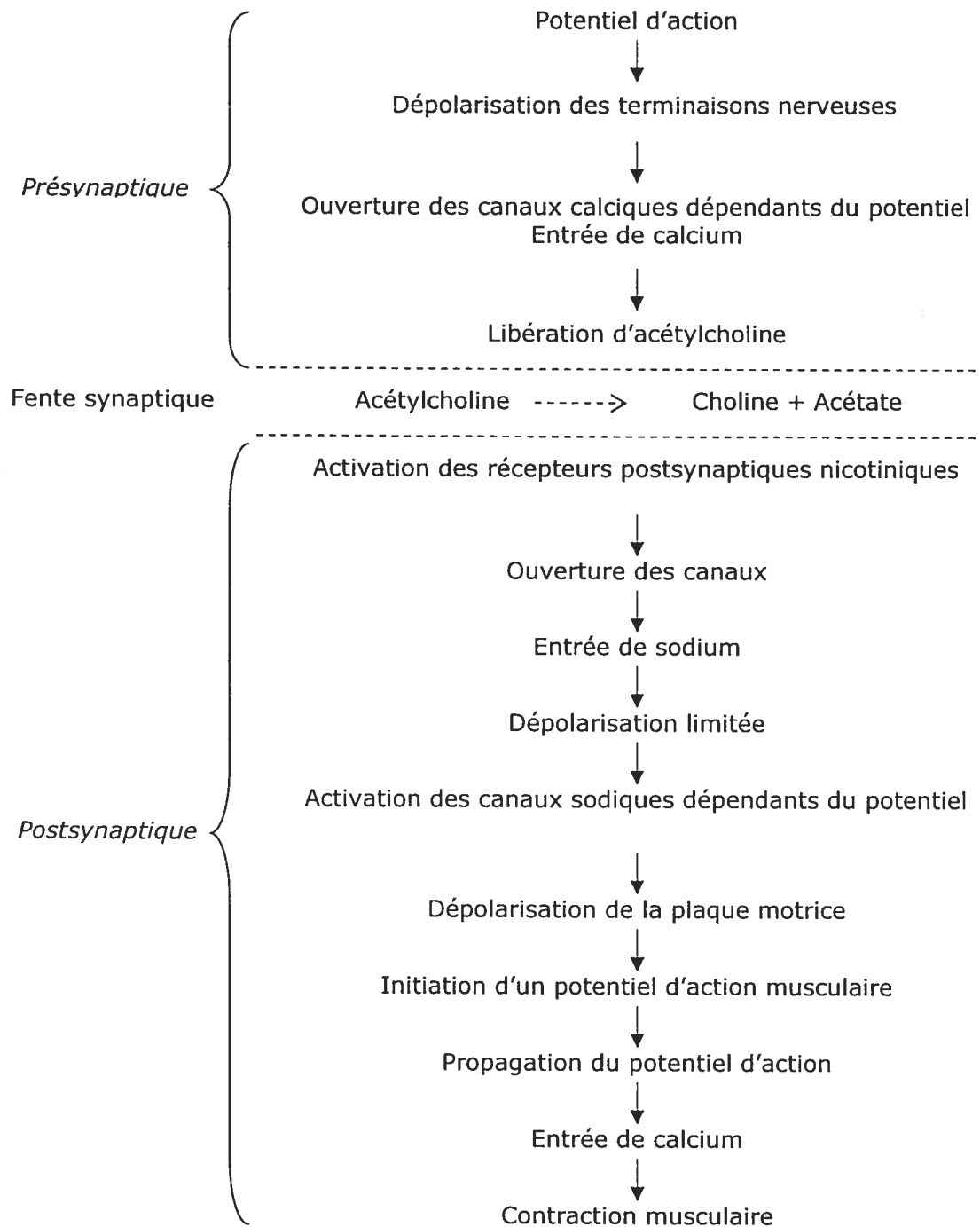


Figure 1: Transmission neuromusculaire normale⁶

1.2.2 Synthèse et mise en réserve de l'acétylcholine

La réaction de synthèse de l'ACh est catalysée par une enzyme, l'acétyltransférase, plus communément appelée ChAT. Son rôle est de transférer l'acétyle de l'acétyl-CoA à la choline. L'acétate est formé majoritairement dans les mitochondries. Toutefois, il peut être issu de la dégradation de l'ACh et recapté par la terminaison nerveuse. L'acétate se lie au coenzyme A dans l'axoplasme pour former l'acétylCoA.⁶ La choline est recaptée dans la fente synaptique suite à la dégradation de l'ACh.

Une fois l'ACh synthétisée, elle est incorporée dans des vésicules par des transporteurs situés au niveau des membranes vésiculaires, les «vesicular acetylcholine transporters» (VACHT). L'ACh est mise en réserve dans ces vésicules à des concentrations superosmotiques (approximativement 300 mM). On préfère le nom de «quantum de transmetteur» à l'ACh contenue dans une seule vésicule (5 000 à 10 000 molécules d'ACh). Ces vésicules renferment aussi de l'adénosine triphosphate (ATP), des protéoglycanes et des ions H^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} .⁷

1.2.3 Mobilisation des vésicules synaptiques et libération du neurotransmetteur

Les vésicules synaptiques sont divisées en sous-groupes: des vésicules immédiatement disponibles à proximité de la zone active (membrane synaptique) et d'autres en réserve. L'arrivée d'un potentiel d'action par l'axone entraîne un influx de sodium dans la membrane induisant l'ouverture du canal calcique dépendant du voltage. Le calcium libéré se lie à la calmoduline, protéine présente au niveau de la terminaison nerveuse. Le complexe calcium-calmoduline active une protéine kinase II, qui va phosphoryler la synapsine I, protéine associée de façon extrinsèque à la surface cytoplasmique des vésicules synaptiques.⁸ Cette phosphorylation favorise l'ancrage des vésicules synaptiques en se liant à divers éléments du cytosquelette dont l'actine à l'intérieur de l'axone terminal. Les vésicules sont ensuite mobilisées vers la zone active proche de la membrane plasmique (Figure 2). Ce processus de mobilisation implique des protéines membranaires associées aux vésicules synaptiques, telles que la synaptogamine, la synaptophysine et la synaptobrevine.⁹

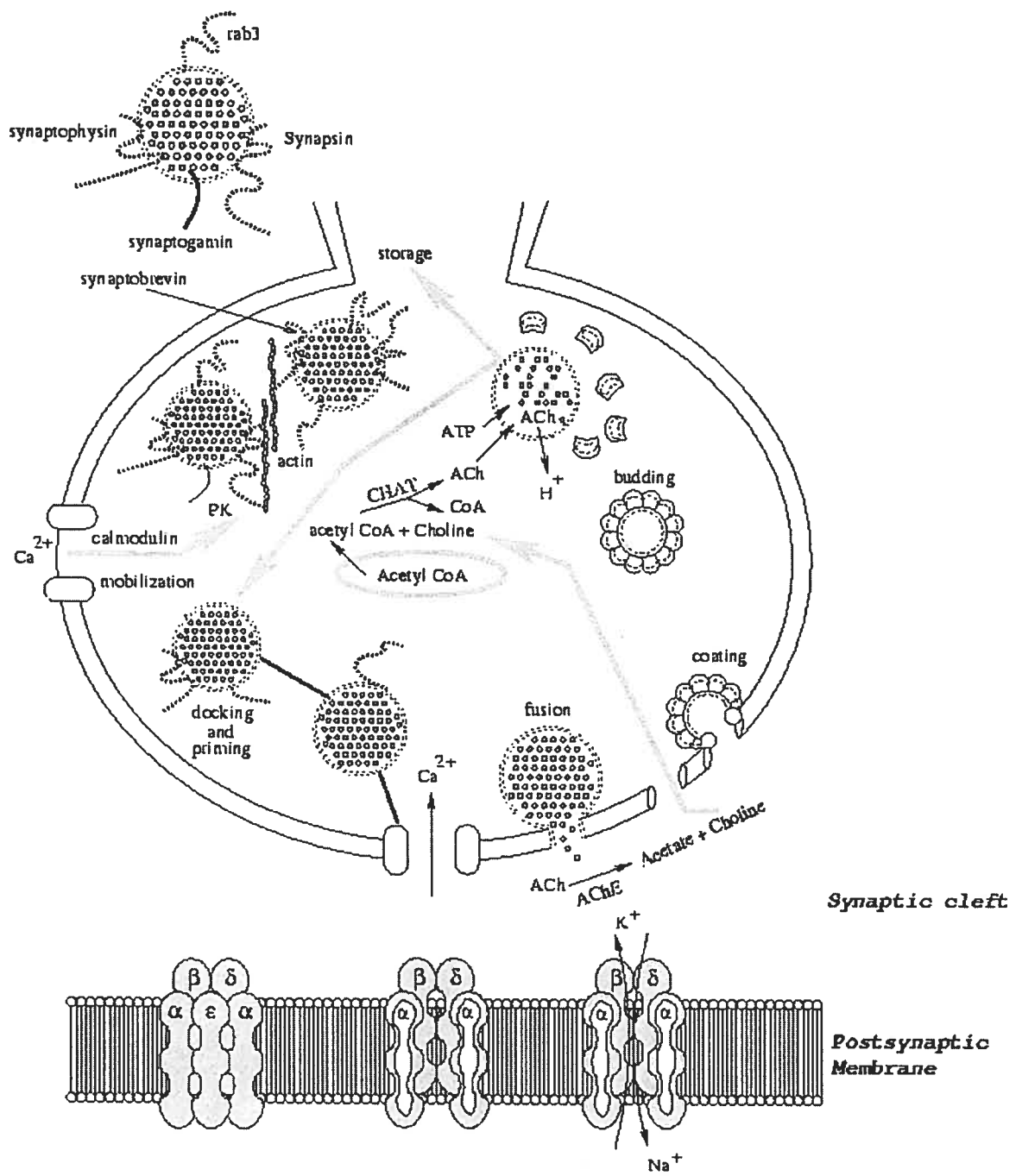


Figure 2: Processus de transmission neuromusculaire: synthèse et mise en réserve de l'acétylcholine, mobilisation des vésicules synaptiques et libération du neurotransmetteur⁸

L'augmentation brusque de la concentration en ions calciques suite à la dépolarisation membranaire fait changer la conformation de la protéine de liaison des vésicules aux sites actifs qui faciliterait la fusion des deux membranes (vésicules et membrane présynaptique) et la libération d'un quantum de milliers de molécules d'ACh dans la fente synaptique par exocytose.¹⁰ Les molécules d'ACh diffusent librement dans la fente synaptique et se lient rapidement au récepteur postsynaptique. Une famille de protéines de faible poids moléculaire liées à la guanosine triphosphate, appelées ``Rabs``, ont été récemment découvertes et sont impliquées dans le processus de fusion des membranes.¹¹

En l'absence de stimulation nerveuse, l'ACh peut être libérée spontanément. En effet, l'ACh dissout dans l'axoplasme fuit à travers la membrane synaptique. Il s'ensuit une dépolarisation faible et persistante de la membrane postsynaptique.⁶ L'ACh est ensuite hydrolysée dans la fente synaptique pour régénérer la choline et l'acétate réutilisables: c'est le processus de recyclage.

Un second type de libération spontanée de quantum d'ACh, dépendant de l'ion Ca^{2+} , donne lieu à un potentiel de plaque miniature (PAM) au niveau de la membrane postsynaptique, celui-ci étant trop faible pour induire une contraction musculaire.⁶

1.2.4 Les récepteurs cholinergiques nicotiniques

1.2.4.1 Récepteurs postjonctionnels

Les récepteurs cholinergiques nicotiniques (nAChR) aussi nommés cholinorécepteurs, sont des récepteurs canaux composés de cinq sous-unités qui forment un pore. Par conséquent, il s'agit d'une protéine transmembranaire pentamérique (Figure 3). Chaque récepteur est ancré à la membrane par des protéines particulières telles que l'agrine, la rapsyne, la laminine, l'alpha-dystroglycan, l'adhaline, l'utrophine, la syntrophine et la spectrine.¹²

La protéine pentamérique est formée de deux sous-unités alpha, d'une sous-unité beta, d'une epsilon et d'une delta.¹³ Les sous-unités sont arrangées en rosette autour d'un canal ionique sodium-potassium¹⁴ selon le modèle de Pedersen et Cohen, soit

$\alpha\epsilon\alpha\beta\delta$.¹⁵ Ces sous-unités constituées de chaînes d'acides aminés semblent posséder un motif commun: Elles sont formées de quatre hélices alpha hydrophobes insérées dans la membrane et de quatre résidus hydrophiles, qui eux, se situent de part et d'autre de la membrane.¹⁶⁻¹⁸ Cependant, ces unités ont différents poids moléculaires ainsi que différentes propriétés.

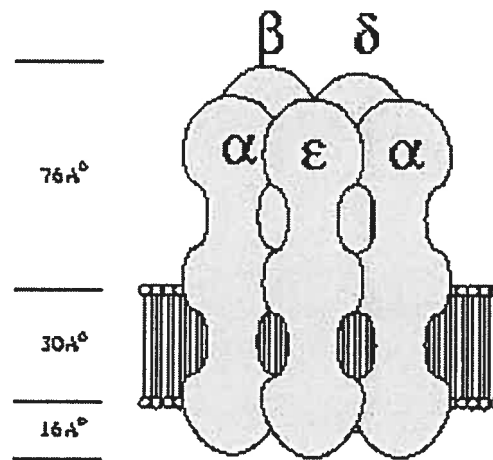


Figure 3: Récepteur cholinergique nicotinique¹⁵

Les deux sous-unités alpha forment les sites pharmacophores de l'ACh et de ses antagonistes tels que les curares.¹⁴ La distance entre ces deux sites a été estimée à 50 Å entre les limites externes et 30 Å entre les limites internes.¹⁹ L'arrangement pentamérique en forme de cercle indique que ces sites récepteurs ne sont pas symétriques ou images miroir. Chaque site récepteur comporte deux sous-sites, un site anionique et un site donneur d'hydrogène.^{14,15,20} Les sous-unités epsilon et delta déterminent, quant à elles, les propriétés pharmacologiques²¹ et physiologiques²² du nAChR. Leur fonction majeure est de stabiliser l'état fermé du récepteur lorsque aucun neurotransmetteur (ou agoniste) n'y est fixé.²³

Lorsque deux molécules d'ACh se lient aux sites hydrophobes extracellulaires des unités alpha de la protéine pentamérique,²⁴ un changement de conformation allostérique est possible.^{25,26} Il s'ensuit une torsion des sous-unités de la protéine qui ouvre alors son pore permettant aux ions sodium de traverser la membrane vers l'intérieur de la cellule et de dépolariser la membrane postsynaptique. Cette dépolarisation entraîne l'activation des canaux sodiques dépendants du voltage, qui amplifient et propagent le potentiel d'action tout au long de la fibre musculaire. Les ions calcium sont alors libérés entraînant une contraction musculaire.

Les pores restent ouverts tant et aussi longtemps que deux molécules de l'agoniste neurotransmetteur restent fixées aux sous-unités alpha. Ce temps n'est pas très long, environ une milliseconde avec l'ACh. La majeure partie de l'ACh est dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme présente dans la fente synaptique²⁷ et fixée sur la membrane synaptique axonique par le biais d'un glycolipide. Son rôle est de transformer l'ACh en choline et en acide acétique. L'acide acétique diffuse hors de la fente synaptique tandis que la presque totalité de la choline est réabsorbée par le neurone présynaptique à l'aide de transporteurs membranaires spécifiques.

1.2.4.2 Récepteurs préjonctionnels

Afin d'augmenter la libération des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique lors de stimulation à haute fréquence, il semble que des récepteurs préjonctionnels situés sur la membrane du neurone présynaptique jouent un rôle.^{28,29} Ces récepteurs sont désignés autorécepteurs, puisque leur régulation est contrôlée par le même neurotransmetteur que celui libéré par la terminaison nerveuse, semblent couplés à des canaux calciques spécifiques⁶ et seraient impliqués dans le mécanisme de libération soutenue de l'ACh par un mécanisme de rétrocontrôle positif.

1.3 Monitoring de la fonction neuromusculaire

Les curares doivent être administrés sous couvert d'un monitoring de la fonction neuromusculaire. Les doses importantes doivent être évitées afin de diminuer l'incidence de paralysies prolongées ou de décurarisations inefficaces, voire les deux.

1.3.1 Principe de la stimulation nerveuse périphérique

La fonction neuromusculaire est monitorée en évaluant la réponse musculaire à une stimulation électrique supramaximale d'un nerf moteur périphérique. La réponse d'un muscle entier dépend du nombre de fibres musculaires activées. Après administration d'agents myorelaxants, la réponse musculaire diminue parallèlement au nombre de fibres musculaires bloquées. La diminution de la réponse lors d'une stimulation constante est le reflet du degré du bloc neuromusculaire.

1.3.2 Modes de stimulation nerveuse

Auparavant, l'évaluation de la fonction neuromusculaire utilisait trois modes de stimulation: la stimulation simple ou isolée, le train-de-quatre (TdQ) et la stimulation tétanique. Deux nouveaux modes sont maintenant disponibles: le décompte post-tétanique (PTC) et la stimulation en salve double (DBS). Le délai d'installation et la durée du bloc neuromusculaire ne dépendent pas uniquement de la dose de BNM administrée mais aussi du type et de la durée de la stimulation.

1.3.2.1 Stimulation simple ou isolée

Une simple stimulation électrique supramaximale est appliquée sur un nerf moteur périphérique à une fréquence inférieure à 0.1 Hz (toutes les 10 secondes).

1.3.2.2 Stimulation en train-de-quatre

Ce mode de stimulation, introduit par Ali et coll³⁰ au début des années 1970, est constitué de quatre stimuli électriques supramaximaux délivrés toutes les 0.5 secondes (2 Hz). Utilisé en mode continu, chaque stimulus en train-de-quatre est répété toutes les 10 ou 12 secondes. Chacun des stimuli du train-de-quatre provoque une contraction musculaire et l'épuisement observé entre ces quatre contractions représente la base de l'évaluation. Ainsi en divisant l'amplitude de la quatrième réponse (T4) par celle de la première (T1), on obtient le rapport du train-de-quatre (TdQ). Lors de la réponse normale, les quatre réponses sont idéalement identiques, le rapport du TdQ est donc égal à 1. Lors d'une curarisation induite par les myorelaxants

non-dépolarisants, ce rapport diminue et est inversement proportionnel au degré du bloc.

L'avantage le plus important de la stimulation en train-de-quatre se rapporte au bloc neuromusculaire induit par les myorelaxants non-dépolarisants. Pour ces derniers, le degré du bloc peut être directement obtenu par la valeur du rapport de TdQ même en l'absence de valeur contrôle.³¹⁻³³

1.3.2.3 Stimulation téτανique

La stimulation téτανique est constituée de stimuli électriques de fréquence élevée (30, 50 ou 100 Hz); 50 Hz délivrés pendant 5 secondes est la fréquence la plus communément utilisée en pratique clinique.³⁴ La stimulation téτανique présente de nombreux inconvénients. Elle est très douloureuse et ne peut donc être utilisée chez un patient éveillé. De plus, surtout à la fin de la décurarisation, la stimulation téτανique peut produire une antagonisation du bloc neuromusculaire au niveau du muscle stimulé.³⁵ Habituellement, la stimulation téτανique est utilisée pour l'évaluation de la curarisation résiduelle. Cependant, sauf en association avec le décompte post-téτανique, la stimulation téτανique a très peu de place dans la pratique anesthésique quotidienne.

1.3.3 Sites de la stimulation nerveuse et réponse des différents muscles

En principe, tout nerf périphérique superficiel peut être stimulé. En pratique anesthésique, le nerf cubital est le site de stimulation le plus utilisé; les nerfs médian, tibial postérieur, péronier commun et facial sont parfois employés.

Comme les différents groupes musculaires ont des sensibilités différentes à l'action des curares, les résultats obtenus sur un muscle ne peuvent pas être extrapolés à d'autres muscles. Le diaphragme est plus résistant que tous les autres muscles à l'effet des curares dépolarisants³⁶ et non-dépolarisants.³⁷ En général, la dose de curare nécessaire pour obtenir un même degré de curarisation, est de 1.4 à 2 fois plus élevée pour le diaphragme que pour l'adducteur du pouce.³⁷ Toutefois, le délai d'installation

de la curarisation est habituellement plus court pour le diaphragme que pour l'adducteur du pouce et le diaphragme se décurarise plus rapidement que les muscles périphériques.³⁸ Les autres muscles respiratoires, le larynx et les muscles de la face sont plus résistants que le diaphragme à l'effet du curare.^{39,40} Les muscles les plus sensibles sont les muscles périphériques des jambes, le masséter et les muscles des voies aériennes supérieures.⁴¹⁻⁴³ La raison précise de ces différences reste inconnue. Les hypothèses probables seraient une marge de sécurité de la jonction neuromusculaire différente entre ces groupes musculaires, la composition en fibres musculaires, le rapport de l'innervation, le débit sanguin musculaire et la température musculaire.⁴¹

Pour étudier la fonction neuromusculaire, l'utilisation de muscles relativement sensibles, tel que l'adducteur du pouce, présente des inconvénients mais aussi des avantages. À l'évidence, c'est un inconvénient pendant la chirurgie car l'absence totale de réponse à une stimulation simple et au train-de-quatre ne permet d'éliminer la possibilité de mouvements diaphragmatiques tels que le hoquet et la toux. Cependant, grâce à l'introduction du décompte post-tétanique, qui permet l'évaluation de blocs très profonds nécessaires à la curarisation complète du diaphragme, cet inconvénient s'est amendé. Du côté des bénéfices, la probabilité de surdoser un patient diminue si la réponse d'un muscle relativement sensible sert de guide à l'administration des curares pendant la chirurgie. Aussi, pendant la phase de récupération, lorsque l'adducteur du pouce est suffisamment décurarisé, une curarisation résiduelle du diaphragme peut être exclue.³⁸

1.4 Pharmacologie des bloqueurs neuromusculaires

1.4.1 Relations structure-activité

La molécule d'ACh, $\text{CH}_3\text{-CO-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3\text{)}_3$, comporte dans sa structure un groupement ammonium positivement chargé, qui serait attiré vers le site anionique du récepteur cholinergique. Cette propriété est commune aux bloqueurs neuromusculaires (BNM), dont la structure renferme au moins un ammonium quaternaire.

Bovet⁴⁴ remarqua à l'origine les différences structurales entre les curares dépolarisants (leptocurares), molécules longues, minces et flexibles et les curares non-dépolarisants (pachycurares), molécules lourdes, épaisses et rigides. L'ACH est la structure de base de la succinylcholine, curare dépolarisant alors que les noyaux stéroïdiens et benzyloisoquinolinium constituent la structure de base des BNM non-dépolarisants (Figure 4 et Figure 5).

La forme et la flexibilité des molécules sont reliées à leur degré de bloc neuromusculaire. Les leptocurares se lient aux centres anioniques du récepteur cholinergique laissant libre passage aux ions dépolarisants autour du canal ionique. À l'opposé, les pachycurares exercent leur effet de blocage non seulement en occupant le site récepteur du canal par leurs groupements fonctionnels, mais aussi en l'encombrant par leur grosse taille. L'encombrement stérique de ces derniers pourrait en partie expliquer leur plus lente diffusion vers le site actif comparativement aux leptocurares.¹⁴

La majorité des curares puissants renferment dans leur structure au moins un groupement méthyle au niveau de l'azote quaternaire. La substitution de ce groupement donne lieu à des composés moins puissants tels que le rocuronium et le rapacuronium comparés au vécuronium.⁴⁵⁻⁴⁷

La chiralité de la molécule peut également intervenir au niveau de l'activité neuromusculaire, le site récepteur étant sensible, sélectif ou spécifique à cette propriété des molécules. Le cisatracurium par exemple, est plus puissant que ses stéréoisomères, du fait que cette molécule se fixe mieux au site récepteur du récepteur cholinergique.¹⁴

Depuis les années 1950, on pensait qu'il fallait une distance interionique optimale de 12 Å à 14 Å (1.2 à 1.4 nm) pour obtenir une activité curarisante maximale. Toutefois, depuis 1964, cette idée a progressivement perdu de son importance. Ainsi, si la succinylcholine peut présenter dans sa configuration étendue des distances interioniques de 12 Å à 14 Å, les stéroïdes tels que le pancuronium et le vécuronium ont des distances de 10 Å à 11 Å (1 à 1.1 nm), respectivement.⁴⁸

La distance interionique et non le nombre d'atomes interposés permet la différenciation entre l'effet curarisant et l'activité ganglioplégique d'un curare. Une distance interionique fixée à 8 Å semble favoriser, chez les BNM biquaternaires stéroïdiens, l'activité ganglioplégique. A l'opposé, ce type d'effet secondaire est minimisé pour des distances de 10, 18 et 21 Å (pancuronium, vécuronium, atracurium, mivacurium).⁴⁸

On a toujours pensé que les composés biquaternaires sont les curares les plus puissants. Cependant, l'avènement du vécuronium, molécule monoquaternaire, nous laisse conclure que l'efficacité curarisante n'est pas nécessairement associée à une forme biquaternaire.¹⁴ En outre, le mivacurium et l'a-tracurium sont des molécules biquaternaires mais leur distances interioniques sont respectivement d'environ 21 Å et 18 Å.

Les propriétés muscariniques (effet vagolytique) semblent particulièrement importantes pour les composés triquaternaires. Les composés biquaternaires, eux ne semblent pas posséder un effet vagolytique puissant ou une propensité à libérer l'histamine.⁴⁸

Les composés aminostéroïdiens, outre leur activité myorelaxante, sont capables de bloquer les récepteurs muscariniques cardiaques (M2) ainsi que la recaptation de la noradrénaline neuronale. Ces effets sont liés à la présence d'un azote quaternaire dans la structure moléculaire.

Les substances benzyloquinoléines libèrent de l'histamine. Pour le mivacurium et l'a-tracurium, cette tendance est réduite par les substitutions du groupe méthoxy et encore davantage, dans le cas de l'a-tracurium par le retrait d'électrons des groupes carboxyles de la chaîne et par l'altération de la stéréochimie (orientation cis) aux positions 1 et 2 de la structure benzyloquinoline.⁴⁹⁻⁵¹ Cet effet a été limité avec le développement de nouveaux dérivés tels que le doxacurium, le cisatracurium et les nouveaux composés asymétriques.^{48,52}

La dégradation des BNM est étroitement liée à leur structure chimique. Bien que le mivacurium, l'a-tracurium et le doxacurium se ressemblent structurellement, la position

de l'oxygène et du groupement carbonyle par rapport à l'azote quaternaire dicte leur mode de dégradation. Si le groupement carbonyle est très proche de l'azote quaternaire (N-OC-O-C-), comme c'est le cas de l'atracurium, la molécule est dégradée chimiquement par la réaction d'Hoffman.^{12,53} Cependant, pour qu'une molécule subisse une hydrolyse enzymatique par la cholinestérase plasmatique, le composé doit être un ester et le groupement éther oxygène doit être à proximité de l'azote quaternaire (N-O-CO-C). C'est le cas du mivacurium.^{12,54} Toutefois, le doxacurium est une exception puisqu'il est éliminé inchangé dans les urines.⁵⁵ Ceci rend plus difficile la compréhension de la relation entre la structure et le mode de dégradation des BNM.

1.4.2 BNM dépolarisants

Au niveau moléculaire, les BNM dépolarisants miment l'effet de l'ACh. Si deux molécules d'agonistes (ACh et/ou curare dépolarisant) s'attachent au récepteur, le canal sodique s'ouvre entraînant une dépolarisation de la plaque motrice. Toutefois, contrairement à l'ACh qui est rapidement hydrolysée dans la fente synaptique, le BNM dépolarisant y demeure beaucoup plus longtemps étant donné que son élimination totale de l'organisme est très lente comparativement à la destruction de l'ACh par les cholinestérases jonctionnelles. Cette présence prolongée entraîne une dépolarisation continue de la plaque motrice qui résulte en une brève période d'excitations répétées, pouvant se manifester par des contractions musculaires transitoires généralisées appelées fasciculations.

Les curares dépolarisants ont une action biphasique caractéristique sur le muscle, le faisant d'abord se contracter puis se relâcher. Le bloc neuromusculaire dit dépolarisant peut même posséder certaines caractéristiques du bloc non dépolarisant.⁵⁶ Pour décrire ces deux types d'effet, le bloc neuromusculaire peut être décomposé en bloc de phase I et de phase II. La phase I consiste en une dépolarisation initiale accompagnée de fasciculations, où le bloc peut être potentialisé par des anticholinestérasiques.⁵⁷ Dans le temps (administration continue) ou après administration de doses répétées, le bloc dépolarisant se transforme en un bloc non dépolarisant de phase II aussi appelé "dual block " ou bloc par désensibilisation, qui est neutralisé par les anticholinestérasiques.⁵⁸

Un autre mécanisme d'action possible des BNM dépolarisants est l'inactivation des canaux sodiques périjonctionnels (au niveau de la plaque motrice).⁵⁹ En effet, une dépolarisation de la plaque motrice entraîne une activation des canaux sodiques pour que le potentiel d'action se propage à l'intérieur de la fibre musculaire. Toutefois, lorsque la dépolarisation est maintenue, les canaux sodiques s'inactivent et leur fonction ne peut être rétablie tant que le potentiel de plaque ne revient pas à son niveau de repos.

1.4.3 BNM non-dépolarisants

Depuis leur première utilisation par Harold Griffith et Enid Johnson en 1942,³ plusieurs BNM de type compétitif, ou non-dépolarisants, ont fait leur apparition sur le marché. Ils ont la propriété de bloquer la jonction neuromusculaire par inhibition compétitive de l'ACh au niveau des récepteurs nicotiques. Ils empêchent la dépolarisation de la plaque motrice en se fixant, d'une manière réversible, aux sous unités alpha du récepteur postjonctionnel. Ainsi, l'ACh ne peut se fixer et l'ouverture du canal ionique ne peut se faire. La liaison de l'antagoniste est réversible et un équilibre dynamique existe, favorisant soit l'agoniste (ACh) ou l'antagoniste dépendamment de leurs concentrations respectives au niveau de la jonction neuromusculaire et de leurs affinités pour le récepteur cholinergique.⁶⁰ L'occupation d'une seule sous-unité alpha par l'antagoniste est suffisante pour empêcher l'ouverture du canal ionique alors que deux molécules d'ACh sont nécessaires pour ouvrir ce canal. Ceci modifie fortement l'interaction compétitive en faveur de l'antagoniste.

Un avantage de ce mécanisme d'action compétitif est la possibilité de neutraliser le bloc neuromusculaire par un excès d'ACh. En effet, l'administration d'un inhibiteur des acétylcholinestérases tel que la néostigmine augmentera les concentrations d'ACh au niveau de la plaque motrice, celle-ci pourra déplacer le BNM de son site de liaison, neutralisant ainsi le bloc neuromusculaire.

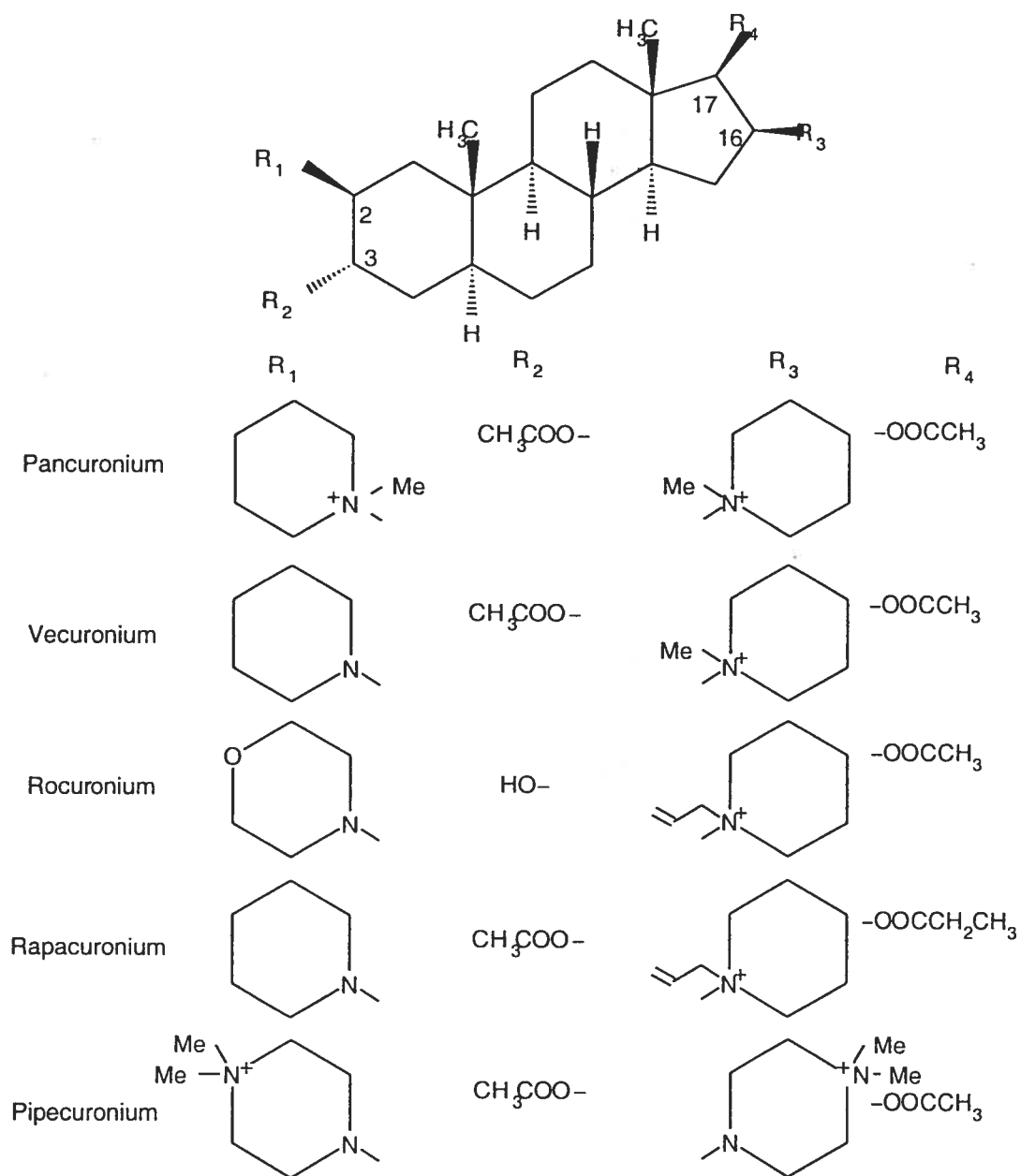
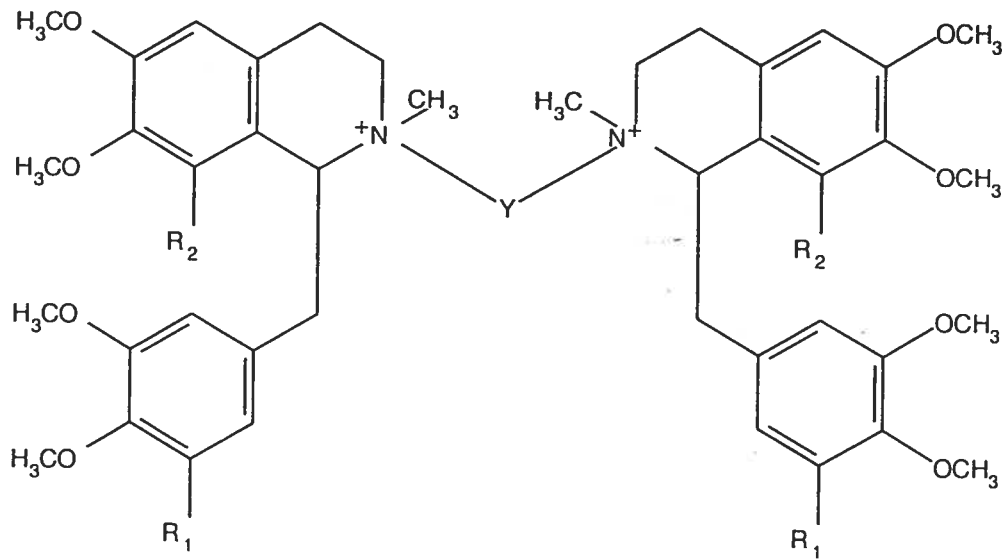


Figure 4: Structure chimique des bloqueurs neuromusculaires stéroïdiens



	Y	R ₁	R ₂
Atracurium	-CH ₂ CH ₂ CO-O(CH ₂) ₅ -O-OCCH ₂ CH ₂ -	-H	-H
Mivacurium	-(CH ₂) ₃ -O-OC(CH ₂) ₂ CH=CH(CH ₂) ₂ CO-O-(CH ₂) ₃ -	-OCH ₃	-H
Doxacurium	-(CH ₂) ₃ -O-OCCH ₂ CH ₂ CO-O-(CH ₂) ₃ -	-OCH ₃	-OCH ₃

Figure 5: Structure chimique des bloqueurs neuromusculaires benzylisoquinolines

Les BNM non-dépolarisants peuvent être classés selon leur famille chimique; les composés stéroïdiens et les substances benzylisoquinolines, ou selon leur durée d'action (longue, courte ou intermédiaire).

1.4.4 Rocuronium

1.4.4.1 Propriétés pharmacocinétiques

Le rocuronium est le dérivé 2-morpholinol³⁺, 3-désacétyl, 16-N-allyl pyrrolidino du vécuronium. Ce composé monoquatenaire appartient à la catégorie des composés stéroïdiens. Cette famille de composés comporte deux types d'avantages: une grande

puissance et une absence de libération d'histamine. Elle a généralement des propriétés vagolytiques, cet effet étant léger à modéré pour le rocuronium.

Le rocuronium est classé parmi les BNM à durée d'action intermédiaire, tout comme le vécuronium et l'atracurium.^{61,62} Il démontre un profil pharmacocinétique semblable à celui du vécuronium sauf pour son volume de distribution à l'équilibre (Vdss) qui est plus faible.^{63,64}

L'analyse pharmacocinétique du rocuronium révèle que, chez des patients ayant reçu une dose d'intubation de 0.6 mg/kg (2x ED₉₀), le volume de distribution à l'équilibre (Vdss) varie entre 0.18 et 0.23 L/kg, la clairance plasmatique totale se situe entre 0.17 et 0.31 L/kg/h, le temps de demi-vie d'élimination se situe entre 69 et 100 minutes et le MRT moyen est de 45 à 65 minutes.^{61,65-67} Il a été rapporté que la clairance du rocuronium se trouve augmentée durant une anesthésie à l'isoflurane comparée à une anesthésie balancée.⁶⁸ D'autres investigateurs ont conclu que les paramètres pharmacocinétiques du rocuronium ne sont pas affectés par le régime anesthésique (isoflurane versus propofol).^{67,69} Chez l'homme, administré en perfusion continue ou sous forme de bolus, le rocuronium conserve ses mêmes propriétés pharmacocinétiques.⁷⁰

Chez le chat, il semble que le rocuronium soit éliminé via la voie hépatobiliaire (76% de la dose administrée). Il est capté par le foie et ensuite excrété dans la bile. L'excrétion biliaire représente 42% de l'élimination du rocuronium dans l'heure suivant son administration et 54% six heures plus tard. Par contre, la contribution du rein semble être minime étant donné que la ligature des voies urinaires influence très peu ou pas l'élimination du rocuronium.⁷¹

Chez l'homme, après administration de 0.6 mg/kg de rocuronium, 12 à 22% de la dose se trouve inchangée dans l'urine.^{61,67} Récemment, il a été démontré que le rocuronium est éliminé sous forme inchangée par excrétion rénale et fécale. Après administration d'une dose de rocuronium variant entre 0.3 mg/kg et 0.9 mg/kg, celui-ci a été retrouvé inchangé dans l'urine (26%) et la bile (7%) 48 h suivant l'administration de la dose. La récupération du rocuronium 4 à 8 heures suivant son administration était de 27% et 31% dans l'urine et les selles, respectivement. Dans le tissu hépatique

provenant de patients ayant subi une hémihépatectomie, la fraction retrouvée de rocuronium 2 à 5 heures suivant la dose variait entre 6 et 13%.⁷²

Jusqu'à maintenant, le seul métabolite de rocuronium détecté dans le plasma est le 17-désacétyl rocuronium, mais à de très faibles concentrations.⁷³ Ce métabolite est 20 fois moins puissant que la molécule-mère et ne semble donc pas contribuer au bloc neuromusculaire dans les circonstances cliniques. Vu que le rocuronium comporte un groupement hydroxyle en position 3 au niveau du noyau stéroïdien, il ne subit pas de décarboxylation pouvant donner naissance à un métabolite pharmacologiquement actif. Par conséquent, le rocuronium est un composé stable dans l'organisme.⁷⁴

Comme la voie hépatobiliaire représente une voie d'élimination importante pour le rocuronium, une anomalie hépatique serait associée à une altération du profil pharmacocinétique du rocuronium.^{73,75,76} Une prolongation de l'effet de bloc neuromusculaire a été également relevée chez des patients cirrhotiques⁷⁷ et chez ceux souffrant de cholestase biliaire.⁷⁸ Ces changements ont été attribués aux changements des paramètres pharmacocinétiques vu qu'une anomalie de la fonction hépatique n'est pas associée à un changement de la sensibilité des récepteurs cholinergiques.⁷³ Bien que le rein joue un rôle important dans l'élimination du rocuronium, la clairance plasmatique se trouve légèrement diminuée chez des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale.⁶⁶

1.4.4.2 Propriétés pharmacodynamiques

Le rocuronium offre d'excellentes conditions d'intubation 60s après administration de 0.6mg/kg.⁷⁹⁻⁸¹ En outre, une dose de 0.3 mg/kg (1xED₉₀) de rocuronium est suffisante pour offrir de bonnes conditions d'intubation mais requiert une anesthésie profonde.⁸²

Le court délai d'action de ce BNM non dépolarisant semble être lié à sa faible puissance^{83,84} et à son degré limité de liaison aux protéines plasmatiques (25%).⁴⁷

Après administration d'une dose de 1 mg/kg de rocuronium chez des patients anesthésiés au protoxyde d'azote, à l'halotane et au fentanyl, le délai d'installation jusqu'au bloc maximum (début d'action) était de 1.7 min. Sa durée d'action jusqu'à la

récupération de 25% de la contraction (durée d'action clinique) était de 53 min. L'intervalle de récupération 25-75% était de 20 min et la durée totale du bloc neuromusculaire de 80 min.⁶⁴

Ces paramètres pharmacodynamiques semblent varier entre les études. En effet, Dragne et coll⁶⁹ ont relevé un début d'action plus long (5 min) et une durée d'action plus courte (20 min) que ceux rapportés par d'autres investigateurs.^{64,67,75,85,86} Vu que le régime anesthésique était comparable dans toutes les études, les différences pharmacodynamiques pourraient être attribuées au type de stimulation utilisé pour monitorer la fonction neuromusculaire.^{87,88}

L'influence de l'agent anesthésiant sur les paramètres pharmacodynamiques est sujet de controverses. D'une part, certains investigateurs ont démontré que le début d'action du rocuronium n'est pas influencé par le régime anesthésique (propofol, halothane ou isoflurane) après administration d'une dose de 0.6 mg/kg. Par contre, la durée d'action est significativement plus courte sous propofol que sous halothane ou isoflurane.^{67,89,90} D'autre part, le bloc neuromusculaire induit par le rocuronium semble être potentialisé par l'isoflurane.^{91,92} Une étude récente révèle qu'après administration d'une dose de 0.5 mg/kg de rocuronium, le régime anesthésiant (propofol versus isoflurane) n'affecte pas la durée clinique et l'indice de récupération. Par contre, après administration d'une deuxième dose de 0.3 mg/kg de rocuronium une heure plus tard, la durée clinique était plus longue chez des patients anesthésiés à l'isoflurane que chez ceux ayant reçu du propofol. Une telle différence est probablement due à une exposition prolongée à l'isoflurane.⁶⁹

1.4.5 Mivacurium

1.4.5.1 Propriétés pharmacocinétiques

Le mivacurium appartient à la famille des benzylisoquinoléines. Il consiste en un mélange de trois stéréoisomères, le *cis trans* (37% w/w), le *trans trans* (57% w/w) et le *cis cis* (6% w/w). Les isomères *cis trans* et *trans trans* constituent les isomères pharmacologiquement actifs, tandis que la contribution de l'isomère *cis cis* à l'activité myorelaxante du mivacurium est considérée négligeable.⁹³

Étant une large molécule polaire, le mivacurium se distribue dans le liquide extracellulaire de l'organisme (Vd de 0.2 L/kg).^{94,95} Des études réalisées *in vitro*⁹⁶ et *in vivo*⁹⁷ démontrent que les isomères *cis trans* et *trans trans* du mivacurium, sont hydrolysés par la cholinestérase plasmatique ou pseudocholinestérase et que l'excrétion rénale est une voie d'élimination mineure pour ces deux isomères (7%). Le scénario est différent pour l'isomère *cis cis*. Il semble que celui-ci soit éliminé majoritairement par voie rénale et également par hydrolyse enzymatique, la vitesse de cette dernière étant beaucoup plus faible que pour les deux autres isomères.⁹⁷⁻⁹⁹

Afin d'élucider l'effet de l'inhibition de la cholinestérase plasmatique sur la pharmacocinétique du mivacurium, Ostergaard et coll¹⁰⁰ ont conduit une étude chez des patients adultes ayant une activité normale des cholinestérases. Deux heures avant l'anesthésie des patients, ils ont administré le bambutérol, un bronchodilatateur inhibiteur de la cholinestérase plasmatique. Ils ont relevé une clairance plasmatique diminuée et un temps de demi-vie prolongé pour les deux isomères actifs. La clairance de l'isomère *cis cis* a été peu affectée par le blocage de l'enzyme. Ceci vient renforcer le fait que cet isomère est peu métabolisé par la cholinestérase plasmatique.

L'hydrolyse enzymatique du mivacurium génère deux types de métabolites inactifs, l'alcool quaternaire (*cis* et *trans*) et le monoester (*cis* et *trans*) à des pourcentages de 44% et 46%, respectivement. Récemment, Laurin et coll¹⁰¹ ont proposé un schéma de dégradation stéréosélective du mivacurium. Le mivacurium en position *trans trans* ou *cis cis* génère des métabolites ester et alcool ayant une configuration géométrique *trans* ou *cis*, respectivement. Ce qui confirme l'absence d'interconversion dans l'organisme. De plus, en démontrant que le mivacurium *cis trans* est converti exclusivement en alcool *trans* et monoester *cis*, Laurin et coll. ont proposé que le groupement ester de l'isomère *trans* soit plus labile.¹⁰¹

Chez des patients adultes, la clairance plasmatique du mivacurium a été estimée à 5.5, 3.2 et 0.25 L/kg/h pour les isomères *cis trans*, *trans trans* et *cis cis*, respectivement. La demi-vie ($t_{1/2 \beta}$) correspondante est de 2.1, 2.3 et 55 minutes.^{95,102} La clairance élevée et la demi-vie courte des deux isomères actifs du mivacurium sont cohérentes avec sa brève durée d'action.

L'estimation des paramètres pharmacocinétiques du mivacurium dépend du site de prélèvement des échantillons sanguins et de la fréquence d'échantillonnage. Lacroix et coll⁹⁵ ont démontré que pour un médicament à élimination rapide tel que le mivacurium, l'échantillonnage intensif (aux 10 sec) s'avère essentiel pour une bonne estimation des paramètres pharmacocinétiques, puisque les 2 premières minutes contribuent énormément à l'aire sous la courbe totale (75% pour *trans trans* et 86 % pour *cis trans*). Si l'aire sous la courbe est sous estimée, la clairance plasmatique et le volume de distribution eux, sont surestimés.

Les propriétés pharmacocinétiques des isomères actifs du mivacurium ne sont pas modifiées chez des patients insuffisants rénaux. Par contre, l'isomère *cis cis* voit sa clairance réduite chez ces patients.⁹⁷ La clairance plasmatique des isomères *cis trans* et *trans trans* se trouve significativement réduite chez les patients cirrhotiques comparés aux patients normaux.⁹⁸ La demi-vie d'élimination se trouve prolongée puisque le volume de distribution demeure inchangé. Ces résultats sont cohérents étant donné que la synthèse hépatique de la cholinestérase se trouve diminuée chez les patients cirrhotiques.⁹⁸ Le même scénario a été décrit pour l'isomère *cis cis* du mivacurium sauf que les différences observées entre les patients normaux et cirrhotiques ne sont pas statistiquement significatives.⁹⁸

1.4.5.2 Propriétés pharmacodynamiques

L'utilisation du mivacurium est recommandée durant les courtes chirurgies, typiquement celles qui durent moins de 30 minutes.⁹³ L'intubation endotrachéale peut s'effectuer rapidement (2 min) suivant une dose de mivacurium de 2 x ED₉₅ (ED₉₅ étant de 58 à 80 µg/kg).¹⁰³ Une intubation peut être obtenue en deça de 90 secondes avec une dose de mivacurium de 3-4 x ED₉₅.¹⁰⁴ Le mivacurium est 0,8 à 4 fois plus puissant que le vécuronium et l'atracurium, respectivement.¹⁰⁵ Sa puissance est encore plus élevée lorsqu'il est administré avec un anesthésique volatil tel l'enflurane ou l'isoflurane.¹⁰⁶

La durée clinique de l'effet de relaxation musculaire (temps entre la fin de l'injection et 25% de récupération) suivant une dose de 2 x ED₉₅ de mivacurium varie entre 16 min (1.2 x ED₉₅) et 25 minutes (4 x ED₉₅). Comparée à l'atracurium et au vécuronium, la

durée de l'effet du mivacurium ne varie pas beaucoup avec la dose. L'indice de récupération défini par le temps nécessaire pour récupérer 25% à 75% de l'activité neuromusculaire, se situe entre 6 et 9 minutes suivant l'administration de doses totales variant entre 100 µg/kg et 240 µg/kg de mivacurium.^{104,107} La récupération de l'effet suivant une perfusion de mivacurium ne semble pas être affectée par la durée de la perfusion, ce qui suggère l'absence d'effet cumulatif.

Les paramètres pharmacodynamiques décrits ci-dessus varient chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique ou encore chez ceux exprimant une faible activité de la cholinestérase plasmatique, enzyme responsable du métabolisme du mivacurium. Ainsi, la durée de l'effet myorelaxant se trouve prolongée chez les patients en insuffisance hépatique qui reçoivent une dose recommandée de mivacurium (0.15 mg/kg).⁹⁹ Après administration de la même dose chez des patients cirrhotiques, le temps requis pour une récupération adéquate se trouve prolongé.¹⁰⁸ Cette prolongation de l'effet myorelaxant reflète probablement une diminution de la synthèse hépatique des cholinestérases.

Une relation inverse a été décrite entre l'activité de la cholinestérase et le temps de réapparition du T1 chez les patients phénotypiquement normaux, ayant une activité normale ou basse de la cholinestérase, qui ont reçu une dose élevée de mivacurium (0.2 mg/kg).¹⁰⁹ Une prolongation du temps de récupération a été également observée chez des patients hétérozygotes pour le gène atypique de la cholinestérase plasmatique.¹¹⁰ Dans l'étude de Ostergaard et coll, cinq patients homozygotes pour le gène atypique de l'enzyme se sont avérés très sensibles au mivacurium et ont récupéré très lentement après avoir reçu une faible dose de mivacurium (0,03 mg/kg).¹¹⁰ De plus, des cas isolés de patients ayant reçu une dose plus élevée de mivacurium et n'ayant pas montré de signes de récupération longtemps après administration de mivacurium, ont été rapportés.¹¹¹

En administrant le bambutérol deux heures avant l'induction d'une anesthésie chez des patients ayant une activité normale des cholinestérases plasmatiques, le temps d'installation de l'effet se trouve plus rapide. Ceci s'explique par le fait qu'en inhibant la cholinestérase par le bambutérol, plus de molécules de mivacurium sont susceptibles d'avoir accès à la jonction neuromusculaire et d'induire l'effet

myorelaxant. Par contre, la durée d'action et le temps de récupération se trouvent prolongés.

1.4.5.3 Cholinestérase plasmatique

Tel que mentionné précédemment, le mivacurium est hydrolysé par la cholinestérase plasmatique encore appelée pseudocholinestérase ou butyrylcholinestérase. Cette enzyme appartient à la famille des estérases non spécifiques. Les pseudocholinestérases ou estérases non spécifiques hydrolysent différents types de substrats. Chaque estérase hydrolyse un type d'ester de façon plus ou moins sélective. On distingue 4 types d'estérases classés selon la Commission Internationale d'Enzymes; l'acétylcholinestérase, la cholinestérase, les carboxylcholinestérases et les arylestérases.¹¹² L'acétylcholinestérase et la cholinestérase hydrolysent préférentiellement les esters choline (acétylcholine et butyrylcholine, respectivement) et peuvent aussi hydrolyser les esters aromatiques et aliphatiques à des taux plus faibles. Les carboxylestérases sont les enzymes de choix pour hydrolyser les esters aliphatiques tandis que les arylestérases hydrolysent seulement les esters aromatiques.¹¹²

La butyrylcholinestérase n'a pas de rôle physiologique évident¹¹² puisqu'on n'a pas encore identifié son substrat endogène. Elle est responsable de l'hydrolyse des composés exogènes.¹¹³ Chez l'homme, la butyrylcholinestérase est présente surtout dans le plasma, le foie et la plupart des tissus tels que le coeur, les poumons, la muqueuse intestinale et le rein. La cholinestérase plasmatique (butyrylcholinestérase) et la cholinestérase tissulaire sont des isoenzymes puisqu'elles sont issues du même gène.¹¹⁴ Ainsi, l'activité des cholinestérases varie peu chez un même individu. Par contre, l'activité cholinestérasique varie d'un individu à l'autre. Cette observation s'est faite vers les années 1950 avec l'utilisation clinique du bloqueur neuromusculaire la succinylcholine.¹¹⁵ Récemment, plusieurs variantes génétiques décrites pour la cholinestérase plasmatique ont permis d'expliquer des réponses pharmacologiques anormales à certains esters métabolisés par cette enzyme tels que la succinylcholine et le mivacurium.^{109,110,115} En effet, les patients qui présentent un phénotype atypique subissent un bloc neuromusculaire intense et prolongé suite à l'administration d'une dose thérapeutique de mivacurium.¹¹⁰ La diminution de l'activité cholinestérasique peut

être acquise, avoir des causes iatrogéniques ou varier selon l'hérédité et l'état physiologique.¹¹²

Afin de mesurer l'activité cholinestérasique dans le plasma d'un individu, Kalow et Genest ont développé une méthode de détection de la cholinestérase atypique. Il s'agit du test de dibucaïne.¹¹⁶ Ce test consiste à évaluer le degré d'inhibition de l'activité cholinestérasique par la dibucaïne (un anesthésique local) en suivant par spectrophotométrie, l'absorbance d'un substrat spécifique (e.g la benzoylcholine). Le numéro de dibucaïne (Dibucaïne Number; DN) correspond au degré d'inhibition exprimé en pourcentage. En utilisant ce test, Kalow et Genest ont démontré que la cholinestérase atypique est plus résistante à l'inhibition par la dibucaïne que la cholinestérase normale et possède un plus petit DN.

La détermination de l'activité enzymatique et le DN ne peuvent pas toujours reposer sur ce modèle primitif, puisqu'on obtient des valeurs ne tombant pas dans les écarts établis pour l'enzyme normale ou atypique. Ceci suggère l'existence d'autres phénotypes distincts des cholinestérases plasmatiques normales et atypiques.¹¹⁵ Une mutation génétique cause une altération de la structure primaire de l'enzyme et entraîne une modification de l'activité de la cholinestérase plasmatique et son degré d'inhibition par la dibucaïne et le fluorure. Pour chaque phénotype identifié, on détermine les variations d'activité cholinestérasique en comparant le DN et le numéro fluorure (Fluoride number; FN).^{115,117}

Dans le cadre de notre projet, il était utile de comparer l'activité de la cholinestérase plasmatique chez l'homme et d'autres espèces animales. En utilisant différents substrats d'estérases non spécifiques, Meyers et collaborateurs ont démontré que parmi les espèces animales, le chien exprimait une haute activité enzymatique en présence de la butyrylcholine.¹¹⁸ Cette activité était même légèrement plus élevée que celle observée chez l'homme. La figure 6 illustre ces résultats.

Récemment, en déterminant l'activité de la cholinestérase chez différentes espèces animales en présence de différents substrats, le chien et le cheval démontraient la plus haute activité enzymatique en présence de butyrylcholine comme substrat.¹¹⁹ Dans une autre étude, Keller et coll ont démontré que, chez le chien, la cholinestérase

plasmatique est présente dans plusieurs tissus tels que le rein, le cerveau, le coeur et le diaphragme mais en plus grande quantité dans le foie.¹²⁰ Toutes ces études citées nous ont permis de choisir le chien comme modèle animal pour la réalisation de nos objectifs.

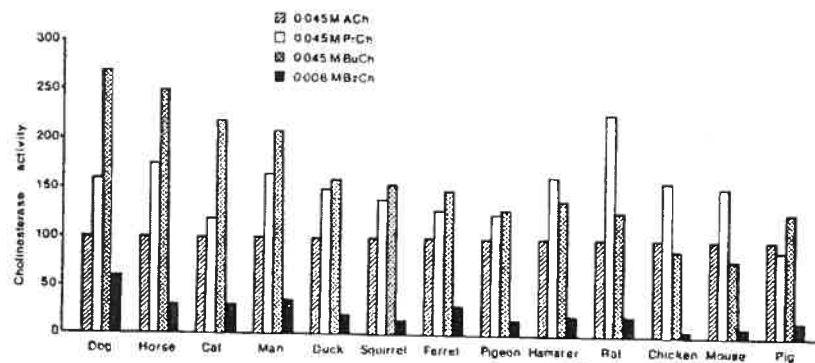


Figure 6: Activité enzymatique et spécificité de substrat des pseudocholinésterases chez différentes espèces¹¹⁸

1.5 Modélisation Pharmacocinétique et pharmacodynamique

1.5.1 Objectifs

La modélisation constitue un outil de choix pour la description quantitative de la relation dose-concentration-effet intégrant pharmacocinétique et pharmacodynamie. Elle fait appel à des modèles mathématiques et statistiques pour décrire des phénomènes biologiques, interpréter des données expérimentales et prédire des réponses d'un système. La modélisation repose sur les deux étapes suivantes: l'élaboration d'un modèle mathématique d'un phénomène et l'ajustement du modèle aux données expérimentales pour l'estimation de paramètres inconnus. L'indice de qualité de l'ajustement prend souvent la forme d'un critère de moindres carrés entre les données expérimentales pharmacocinétiques et pharmacodynamiques mesurées au cours du temps et les prédictions de ces valeurs. Lorsque le modèle décrit les données

de façon adéquate, on obtient des estimés des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. A l'issue de ces deux étapes, la modélisation doit avoir permis de passer d'un ensemble de données «expériences-spécifiques» à un modèle mathématique et à des valeurs de paramètres qui fournissent un résumé «expérience-indépendant».¹²¹

1.5.2 Modèles pharmacocinétiques compartimentaux

1.5.2.1 Définition

Les modèles pharmacocinétiques sont des représentations simplifiées de l'organisme. Leur raison d'être est de permettre soit d'expliquer des résultats expérimentaux soit de résumer des données nombreuses de concentrations, en général, plasmatiques et/ou urinaires, par un nombre restreint de paramètres caractéristiques. Le modèle a aussi l'intérêt de permettre la prédiction du comportement du médicament en situation thérapeutique.¹²¹

Un système compartimental est constitué d'un ensemble fini de sous unités macroscopiques appelées «compartiments» dont chacune contient de la matière bien mélangée et homogène. Le modèle compartimental représente les échanges de matière entre les compartiments et les constantes de transfert, k , servent à définir les vitesses d'échanges de la matière entre un compartiment et l'extérieur ou entre deux compartiments. La loi de conservation de masse régit les transferts entre les compartiments.

1.5.2.2 Modèle compartimental avec élimination centrale : Application aux BNM

A la suite d'une injection intraveineuse, la concentration plasmatique d'un BNM diminue d'abord rapidement (phase de distribution) puis lentement (phase d'élimination). La courbe des concentrations en fonction du temps peut être représentée mathématiquement par des équations bi ou tri-exponentielles selon la forme suivante:¹²²

$$C_p(t) = Ae^{-at} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\gamma t}$$

La figure 7 illustre un modèle pharmacocinétique linéaire classique à deux compartiments. Ces compartiments sont des concepts mathématiques qui ne représentent pas des espaces physiologiques réels. Généralement, le sang et les organes bien perfusés (foie et reins) sont assimilés au compartiment central alors que les tissus moins bien perfusés tels que le muscle et la graisse sont assimilés au compartiment périphérique.¹²³ C'est pour cela qu'on considère que l'élimination des médicaments dépendante des organes (métabolisme hépatique, excrétion rénale ou biliaire) est confinée au compartiment central, dans la plupart des cas.

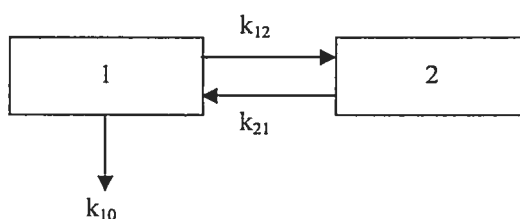


Figure 7: Représentation schématique d'un modèle pharmacocinétique linéaire classique à deux compartiments. Les termes k sont les constantes de la vitesse de transfert du produit entre les compartiments, dans la direction des flèches.

1.5.2.3 Modèle compartimental avec élimination centrale et périphérique : Application aux BNM

Dans le domaine des BNM, les limites du modèle traditionnel avec élimination centrale sont de plus en plus reconnues.¹²⁴ Pour certains BNM dont l'élimination est indépendante des organes tels que le mivacurium (hydrolyse enzymatique),¹²⁵ l'atracurium (hydrolyse chimique et enzymatique)¹²⁶ et le cisatracurium (hydrolyse chimique),¹²⁷ il est probable que le modèle compartimental précédemment décrit ne serait pas applicable puisque l'élimination dans le compartiment périphérique ne peut être exclue.

Dans de telles circonstances, introduire une constante d'élimination dans le compartiment périphérique (k_{20}) du modèle semble être plus adéquat (Figure 8). Cette constante k_{20} serait la perte par métabolisme qui pourrait avoir lieu à cet endroit. Un tel modèle a été proposé pour décrire l'évolution des concentrations plasmatiques de l'atracurium en fonction du temps.¹²⁸

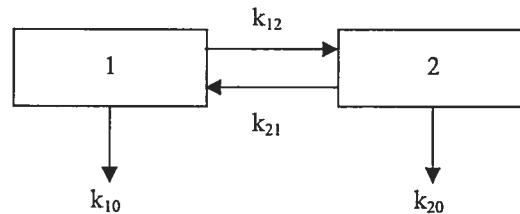


Figure 8: Représentation schématique d'un modèle pharmacocinétique linéaire à deux compartiments avec élimination des compartiments central et périphérique. Les termes k sont les constantes de vitesses de transfert du produit entre les compartiments, dans la direction des flèches.

Dans un modèle pharmacocinétique traditionnel avec élimination centrale, les trois microconstantes k_{12} , k_{21} et k_{10} peuvent être résolues.¹²⁹ Par contre, lorsqu'une microconstante additionnelle, k_{20} , est introduite dans le modèle, celui-ci devient non identifiable. C'est à dire que les microconstantes k_{12} , k_{21} , k_{10} et k_{20} n'ont pas de solution unique. Afin d'obtenir des solutions uniques pour chacune des microconstantes, il faut soit faire des prélèvements dans le compartiment 2 soit fixer par hypothèse *a priori* la valeur d'une ou de plusieurs microconstantes.¹³⁰

Pour ce faire, il a été proposé de substituer la valeur de k_{20} par la vitesse de dégradation obtenue après incubation du plasma *in vitro* ($k_{in\ vitro}$).⁵³ Pour le cisatracurium, k_{20} a été fixée à une valeur historique, préalablement déterminée *in vitro* chez des volontaires sains.¹³¹ Plus récemment, en déterminant la valeur de $k_{in\ vitro}$ dans le plasma pour chaque patient inclu dans l'étude pharmacocinétique, cette

approche a été appliquée avec succès à la succinylcholine,¹³² à l'atracurium (Données non publiées) et au cisatracurium.¹³³

En appliquant ce modèle pharmacocinétique compartimental avec élimination périphérique au cisatracurium,^{127,134-137} on suppose que la dégradation d'Hoffman, processus dépendant du pH et de la température, se fait à la même vitesse dans les compartiments central et périphérique. Cependant, cette supposition ne peut être vraie lorsqu'il s'agit d'hydrolyse enzymatique puisque l'activité enzymatique peut être différente entre le plasma et les tissus. Ainsi, la prémisse de base ($k_{20} = k_{in\ vitro}$) pour un modèle avec élimination périphérique ne peut être applicable aux médicaments éliminés par hydrolyse enzymatique tels le mivacurium.¹³⁸

Dans la modélisation pharmacocinétique compartimentale, lorsqu'on ignore l'élimination périphérique, les paramètres pharmacocinétiques dépendants du site d'élimination tels que le volume de distribution à l'équilibre (Vdss) et temps de transit moyen (MRT) peuvent être affectés.¹³⁹ Une sous-estimation du Vdss a été rapportée pour le cisatracurium^{127,134,140} et le mivacurium,⁹⁵ lorsqu'un modèle pharmacocinétique conventionnel (élimination centrale) a été utilisé pour dériver les paramètres pharmacocinétiques. Laurin et coll¹⁴¹ ont démontré que les BNM ayant une courte demi-vie tel que le mivacurium, sont plus affectés par l'introduction de l'élimination périphérique dans le modèle, comparés aux BNM ayant une longue demi-vie tel que le doxacurium.¹⁴¹ Ceci est dû au fait que, dans le cas du mivacurium, la phase de distribution occupe la majeure partie de l'aire sous la courbe totale.¹⁴¹

1.5.3 Modèles pharmacodynamiques

Les modèles pharmacodynamiques visent à décrire la relation entre la concentration du médicament et son effet. Ces modèles, indépendants du temps, peuvent être classés en quatre types

Modèle linéaire: c'est la relation la plus simple entre concentration et effet et qui peut être exprimée par:

$$E = S.C + E_0$$

où S est la pente de la courbe et E_0 est la valeur de l'effet en l'absence du principe actif.

Modèle log-linéaire: la transformation en valeur logarithmique de la concentration entraîne, entre 20% et 80% de la valeur de la réponse maximale, une relation linéaire:

$$E = S \log C + I$$

Modèle effet maximal: ce modèle dérivé de la théorie des récepteurs est une transformation dans un domaine de concentration particulier de la courbe qui doit relier concentration et effet si l'on admet l'existence de récepteurs et l'intervention d'agonistes entraînant l'effet mesuré. En pratique, la relation dose-réponse est décrite par une courbe de forme sigmoïde. La relation décrivant cette formulation théorique est une fonction hyperbolique:

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C}$$

où E_{\max} est l'effet maximal atteignable avec le médicament étudié, E est l'effet observé, EC_{50} est la concentration qui produit 50% de l'effet maximal

Modèle Sigmoïde Emax: l'équation proposée empiriquement par Hill est une modification de l'hyperbole précédente permettant de décrire de façon améliorée la forme sigmoïde. Mathématiquement, elle s'exprime par:

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$$

La valeur γ est le facteur de sigmoïdité de la courbe. C'est plus souvent un paramètre empirique permettant simplement un meilleur lissage des données expérimentales.

1.6 Modèles Pharmacocinétiques-pharmacodynamiques (PK/PD)

1.6.1 objectifs

On cherche à décrire la relation entre concentration plasmatique et intensité de l'effet pharmacologique. Le cas où l'effet est relié directement à la concentration

plasmatique est rarement observé. Bien souvent, la représentation graphique des concentrations plasmatiques et de l'effet révèle un cycle d'hystérèse antihoraire (dans le sens inverse des aiguilles d'une montre). Il s'agit d'un décalage temporel entre l'augmentation des concentrations plasmatiques et celle de l'effet pharmacologique.^{142,143}

En raison du décalage temporel précédemment décrit, Sheiner et coll¹⁴⁴ ont proposé d'adjoindre au modèle compartimental pharmacocinétique classique un compartiment effet hypothétique qui, par l'apport négligeable de masse, ne perturbe pas le modèle pharmacocinétique, mais permet de définir une constante de vitesse K_{e0} caractérisant les propriétés cinétiques de l'effet. Ce modèle permet sans difficulté d'incorporer n'importe quel modèle pharmacodynamique statique pour la description de la relation concentration-effet.

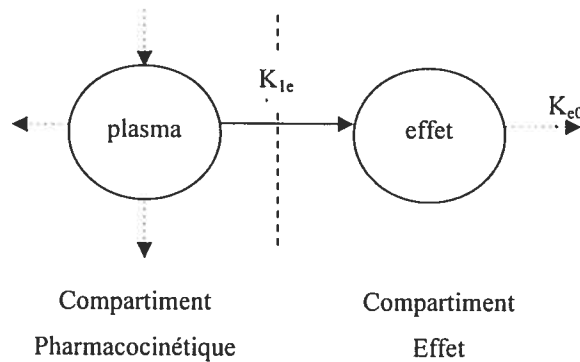


Figure 9: Modèle de lien PK/PD

Le concept de compartiment effet a été introduit pour modéliser la relation concentration-effet de la d-tubocurarine.¹⁴⁴ En mesurant les concentrations plasmatiques du BNM et le bloc neuromusculaire (twitch) à la fois pendant les phases d'installation et de récupération de l'effet, et en appliquant un modèle PK-PD, il était

possible de réduire l'hystérèse de la courbe concentration-effet et d'estimer les concentrations du BNM dans la jonction neuromusculaire (C_e). Le modèle sigmoïde E_{\max} a permis de relier la concentration effet (C_e) au bloc neuromusculaire (E) et d'en dériver la EC_{50} , la concentration effet produisant 50 % de l'effet maximal et γ , le facteur de sigmoïdité de la courbe.

Différentes approches de modélisation PK-PD, incluant l'approche paramétrique, semi-paramétrique et non paramétrique, ont été proposées.

1.6.2 Approche paramétrique

Cette approche paramétrique proposée par Sheiner et coll.¹⁴⁴ implique une connaissance *a priori* des modèles pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et de lien PK-PD. Tout d'abord, il faut estimer les paramètres cinétiques en décrivant la concentration du médicament en fonction du temps par un modèle pharmacocinétique compartimental approprié. Ensuite, ces paramètres étant fixés, il faut appliquer simultanément un modèle de lien paramétrique et un modèle pharmacodynamique (sigmoïde E_{\max}) à la courbe représentant l'effet en fonction du temps. Les paramètres de lien PK-PD (k_{e0}) et pharmacodynamiques (EC_{50} et γ) seront estimés par une analyse de régression des moindres carrés. Étant donné que le k_{e0} caractérise l'aspect temporel de l'équilibre entre les concentrations plasmatiques et l'effet, son estimation est nécessaire pour transformer les concentrations plasmatiques en concentrations effet (dans la biophase).

L'équation différentielle décrivant le profil cinétique du médicament dans le compartiment effet est la suivante:¹⁴⁴

$$\frac{dX_e}{dt} = X_1 k_{1e} - X_e k_{e0}$$

où X_e est la quantité dans le compartiment effet, X_1 est la quantité dans le compartiment central, k_{1e} est la constante de transfert de premier ordre entre le compartiment pharmacocinétique et le compartiment effet, k_{e0} est la constante de transfert du premier ordre hors du compartiment effet

En divisant les deux termes de cette équation par le volume de distribution du compartiment effet (V_e), on obtient la concentration effet (C_e). Le volume de distribution du compartiment effet (V_e) a pu être estimé en posant le postulat que le coefficient de partage entre les concentrations plasmatiques (C_p) et les concentrations effet (C_e) est égal à 1.¹⁴⁵

$$C_e(t) = \frac{X_e}{V_e} = \frac{D \cdot k_{e0} (e^{-k_{10}t} - e^{-k_{e0}t})}{(k_{e0} - k_{10})V_1}$$

La concentration effet (C_e) peut être liée directement à l'effet mesuré en utilisant le modèle pharmacodynamique sigmoïde E_{max} :

$$E = \frac{E_{max} \cdot C_e^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_e^\gamma}$$

1.6.3 Approche semi-paramétrique

La méthode de Sheiner a été légèrement modifiée par Fuseau et coll.¹⁴³ Cette approche diffère par le fait que le modèle pharmacodynamique n'est pas défini *a priori*. Les paramètres pharmacocinétiques sont déterminés en décrivant la concentration en fonction du temps par un modèle compartimental approprié. Ces paramètres pharmacocinétiques permettent ensuite de prédire les concentrations effet, qui seront par la suite représentées en fonction de l'effet observé. La courbe obtenue est une hystérèse antihoraire. Le k_{e0} , estimé indépendamment du modèle pharmacodynamique, est déterminé de manière à ce que les distances entre les phases ascendantes et descendantes de l'hystérèse soient minimisées et que les deux phases se superposent. L'idée est de choisir k_{e0} de manière à ce que les deux branches de l'hystérèse soient superposées et qu'une seule mesure d'effet soit associée à une valeur donnée de C_e . Une fois la valeur optimale de k_{e0} obtenue, le modèle pharmacodynamique choisi permettra de dériver EC_{50} et γ .

1.6.4 Approche non paramétrique

Cette approche ne repose sur aucune présupposition concernant le modèle cinétique.¹⁴⁶ Ce modèle requiert l'introduction simultanée de la concentration et de l'effet pour chaque temps. La valeur optimale du k_{e0} est obtenue par itérations successives jusqu'à ce que la distance entre les branches ascendantes et descendantes de l'hystérèse de l'effet en fonction des concentrations plasmatiques soit minimisée. La relation concentration-effet obtenue peut être alors modélisée selon l'équation sigmoïde E_{max} et les paramètres EC_{50} et γ peuvent être dérivés.

L'utilisation directe des données expérimentales brutes d'effet et de concentrations permet d'éviter toute perte d'information mais dépend très fortement de la qualité des données recueillies. De plus, puisque le triplet temps-concentration-effet est utilisé dans ce modèle, une opération d'interpolation ou d'extrapolation est nécessaire dans le cas de données manquantes. Ceci pourrait biaiser l'estimation des paramètres PK-PD.

1.7 Quantification des xénobiotiques dans la biophase: Application aux BNM

En appliquant les modèles PK-PD précédemment décrits pour établir la relation concentration-effet d'un médicament, les concentrations plasmatiques observées sont souvent utilisées pour dériver les concentrations effet dans la biophase. La détermination expérimentale des concentrations des BNM dans la biophase (muscle) serait cruciale pour relier adéquatement l'effet pharmacologique à la concentration réelle au site d'action. Le but de ce chapitre est de réviser en premier, la diffusion des médicaments dans le liquide interstitiel et ensuite de décrire une méthode permettant l'accès à la biophase, représentée par le muscle.

1.7.1 Distribution des médicaments dans le liquide interstitiel

Une fois dans la circulation sanguine, les médicaments vont se distribuer dans tout l'organisme. Généralement, la distribution se fait dans l'espace extracellulaire (plasma et liquide interstitiel) et peut aussi comprendre le volume cellulaire. Plusieurs facteurs

tels que la diffusion tissulaire et la liaison aux protéines influencent la distribution extravasculaire des médicaments.

La diffusion tissulaire est elle-même dépendante de plusieurs facteurs tels que les caractéristiques physicochimiques des médicaments (lipophilie), la capacité du médicament à franchir les parois vasculaires et cellulaires, la fixation protéique (sanguine et tissulaire) et le débit sanguin tissulaire. Afin de pouvoir comprendre les principes de diffusion tissulaire, il serait nécessaire de faire un rappel physiologique sur les échanges à travers la paroi capillaire.

1.7.1.1 Rappel physiologique

1.7.1.1.1 Organisation générale de la paroi capillaire

Depuis 1952 et pendant plus de 20 ans, la perméabilité capillaire fut interprétée dans le cadre de la théorie des pores de Pappenheimer.¹⁴⁷ Par analogie à la physique des membranes artificielles, cette théorie décrivait le capillaire comme une barrière inerte et imperméable percée de deux sortes de pores, des petits et des gros. Jamais on ne put déceler ces pores parmi les nombreux détails de la structure endothéliale étudiée en microscopie électronique. Les approches récentes ont pu préciser l'intervention active de l'endothélium dans les échanges transcapillaires.

Fondamentalement, la séparation entre le plasma et le liquide interstitiel comprend quatre couches concentriques, de composition et fonction différentes, se comportant comme une unité morfo-physiologique:

l'interface plasma-endothélium: Ce n'est pas une entité bien définie. Cette zone de transition entre le plasma et l'endothélium est une composite de protéines plasmatiques adsorbées (alpha 2-macroglobuline, fibrinogène, héparine, albumine..) et du glycocalix de l'endothélium. Le glycocalix endothélial recouvre la surface luminale, se poursuit sur les vésicules contactant cette surface et dans les interstices entre deux cellules voisines jusqu'aux jonctions intercellulaires.¹⁴⁸

l'endothélium: C'est une monocouche de cellules épithéliales squameuses très aplaties (0.1-0.5 μm) connectées par des jonctions intercellulaires, interposée entre deux compartiments liquidiens : le plasma et le liquide interstitiel. Les cellules endothéliales sont métaboliquement très actives et différenciées pour moduler l'échange bidirectionnel entre les deux milieux. A l'opposé des autres épithéliums simples, l'endothélium est extrêmement perméable à l'eau et aux solutés y compris les macromolécules. La cellule endothéliale contient une population abondante de vésicules membranaires de taille relativement constante (ϕ 60-80 nm) responsables du transport quantal de substances à travers l'endothélium, et candidates au rôle de «larges pores» des physiologistes. Les vésicules augmentent la surface endothéliale réelle, elles diminuent la distance de diffusion à travers le cytoplasme. Le nombre de vésicules par unité de volume varie d'un type de capillaire à l'autre. Par exemple, les vésicules sont 5 fois moins nombreuses dans le capillaire pulmonaire que celui du muscle, et encore plus rares dans les capillaires du cerveau.¹⁴⁸

La lame basale: Les cellules endothéliales reposent sur une lame basale dont les composants (collagène, glycoprotéines..) sont produits par la cellule elle-même. Cette lame basale est continue autour des capillaires continus et fenêtrés, discontinue autour des sinusoides.¹⁴⁸

La matrice sous-endothéliale: Elle joue un rôle important dans le flux de solutés à travers la paroi capillaire. Cette matrice se compose de fibrilles enrobées de substance fondamentale amorphe, dans laquelle percole le liquide interstitiel.¹⁴⁸

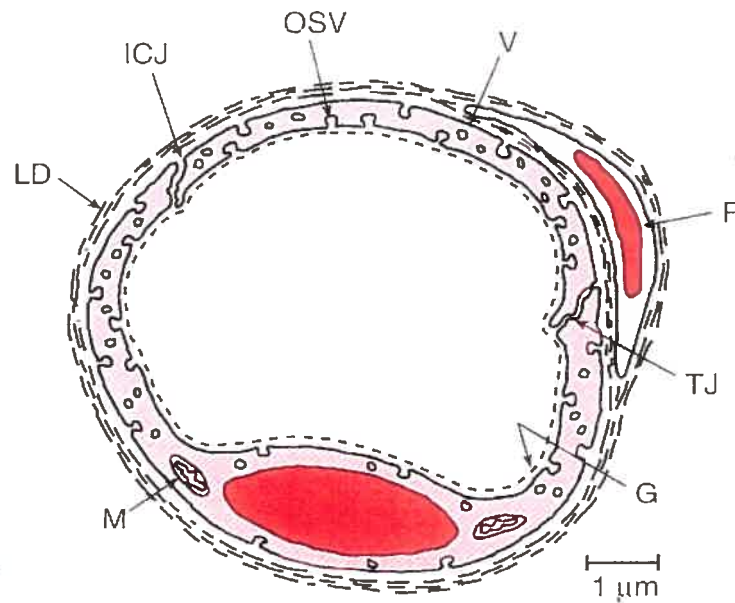
1.7.1.1.2 Différents types de capillaires

Les capillaires continus: Les capillaires continus se trouvent au niveau du muscle, de la peau, des poumons et du système nerveux. La circonférence comprend un anneau continu de 1-3 cellules endothéliales avec une membrane basale continue.¹⁴⁹

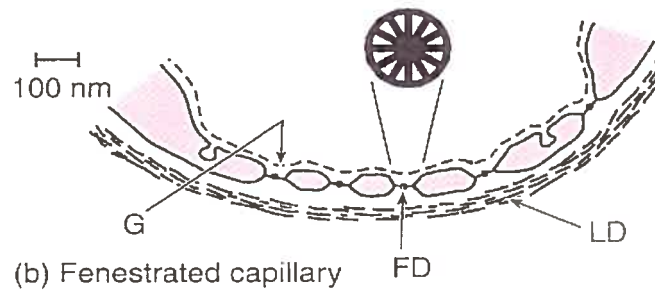
Les capillaires fenêtrés: L'endothélium est perforé de plusieurs petites fenêtrées circulaires ayant un diamètre de 50-60 nm.¹⁴⁹ Ces fenêtrées sont spécialisées dans la filtration rapide des solutés. Les capillaires fenêtrés sont plus perméables à l'eau et aux solutés hydrosolubles que les capillaires continus. Ils sont présents dans les tissus

tissus spécialisés dans les échanges de fluides tels que les reins, les glandes exocrines et les glandes endocrines.

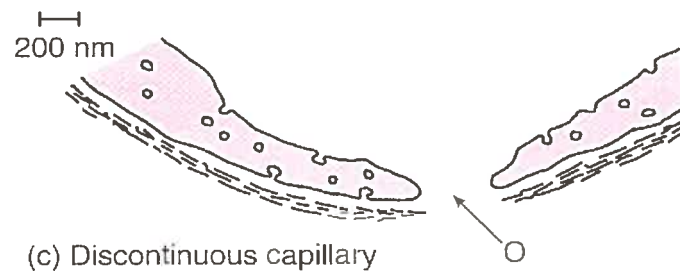
Les capillaires discontinus: Les capillaires discontinus appelés encore capillaires sinusoidaux contiennent des fentes endothéliales de 100 nm de largeur. Ces fentes sont discontinues au niveau de la membrane basale et sont alors perméables aux protéines plasmatiques.¹⁴⁹



(a) Continuous capillary



(b) Fenestrated capillary



(c) Discontinuous capillary

Figure 10: Différents types de capillaires. FD, Diaphragme fenêtré, G, Glycocalyx, ICJ, Jonction intercellulaire, LD, Lamina Densa, M, Mitochondrie, O, fente ouverte (Open gap), OSV, Caveola, P, Pericyte, TJ, Jonction étroite (tight junction), V, vésicule¹⁴⁹

1.7.1.1.3 Vasculature musculaire

L'arrangement de la vasculature musculaire a été bien décrit.^{150,151} Les capillaires sont arrangés parallèlement aux cellules musculaires avec une moyenne de 2-5 capillaires par cellule dépendamment de l'épaisseur et de la capacité oxydative des fibres musculaires.¹⁵² Chez le rat, les capillaires du muscle cremaster ont une longueur de 600 μm (400-800 μm), un diamètre de 6 μm et sont connectés aux capillaires adjacents toutes les 200 μm (100-300 μm).¹⁵² Un important paramètre physiologique est la surface capillaire totale, estimée à 6200-24000 $\text{cm}^2/100 \text{ g}$.^{147,151} La variabilité de la surface capillaire est proportionnelle à la capacité oxydative des fibres musculaires.^{150,152}

Les capillaires du muscle squelettique sont de type A1a¹⁵³. Ils sont équipés d'une membrane basale continue, d'un endothélium continu et d'un revêtement péricapillaire cellulaire incomplet. Les cellules endothéliales sont subdivisées en quatre régions: la zone périphérique, la région organelle, la région nucléaire et la zone parajonctionnelle, occupant respectivement 40, 20, 30 et 10 % du volume total endothélial au niveau du diaphragme de rat.¹⁵⁴

La caractéristique majeure de l'endothélium capillaire au niveau du muscle est l'abondance de vésicules (600 vésicules par μm^3 de cellule) occupant 13% du volume cellulaire total.^{154,155} Ces vésicules sont en réalité des invaginations complexes des membranes cellulaires.¹⁵⁶ De plus, il a été proposé que certains canaux transendothéliaux résultant de la fusion de ces invaginations,¹⁵⁷ représentent le système de petits pores.¹⁵⁸

Au niveau du muscle, les cellules endothéliales sont entourées d'une couche de glycocalix négativement chargée. Les jonctions étroites inter-endothéliales ou «tight junctions» occupent 0.1% de la surface capillaire luminale permettant le passage de divers solutés. En 1979, Wissig¹⁵⁹ était le premier à décrire le chemin tortueux que traversent les molécules lorsqu'elles empruntent les jonctions inter-endothéliales. Il semblerait que la perméabilité capillaire obéisse à un gradient artérioveineux qui fait qu'elle soit plus importante vers la terminaison veineuse.¹⁶⁰ Cette différence de

perméabilité capillaire est probablement due à la plus forte densité des petits pores du côté veineux.¹⁶¹

La balance des fluides à travers le capillaire est déterminée par la pression hydrostatique et la pression osmotique colloïdale interstitielles.¹⁶² Le liquide interstitiel ayant un volume de 8-20 ml/100g¹⁶² contient du collagène, des glycosaminoglycanes, des sels et des protéines.¹⁶³ La quantité importante de glycosaminoglycanes négativement chargées suggère des propriétés d'échange cationique de l'interstitium.^{164,165}

1.7.1.2 Échanges transcapillaires

En somme, les principaux événements concernés dans les échanges transcapillaires peuvent être résumés comme suit (Figure 11):

Le passage transmembranaire, incluant la traversée séquentielle d'une membrane plasmique, puis du cytoplasme, puis de la membrane plasmique de l'autre face cellulaire. La membrane endothéliale est relativement perméable à l'eau, aux petites molécules non polaires et aux molécules lipophiles. Dans les régions étroites, ou des vésicules qui se font face s'ouvrent simultanément sur les fronts opposés, ou si la paroi endothéliale est extrêmement mince, cette voie devient particulièrement courte.

Le passage extramembranaire, qui revêt bien des formes différentes et que l'on peut rassembler sous deux catégories: interendothélial et transendothélial.

Le passage interendothélial: représenté par des jonctions entre cellules endothéliales, perméable à l'eau et aux petits solutés (< 1.7 nm), probablement non sélectif. Le glycocalyx joue un rôle dans la perméabilité de l'endothélium continu aux solutés et à l'eau. Il agit comme un pore sélectif en excluant les macromolécules.¹⁶⁶ Étant donné le caractère ionique des BNM et leur faible lipophilie, ces molécules diffuseraient à travers les jonctions inter-endothéliales pour atteindre le liquide interstitiel.

Le passage transendothélial: représenté par les vésicules, les canaux et les fenêtres. Là s'opère un tri en fonction de la charge et de la taille des molécules. Les protéines

anioniques passent de préférence par les vésicules et les canaux alors que les fenêtres augmentent énormément la perméabilité à l'eau et aux petits solutés.

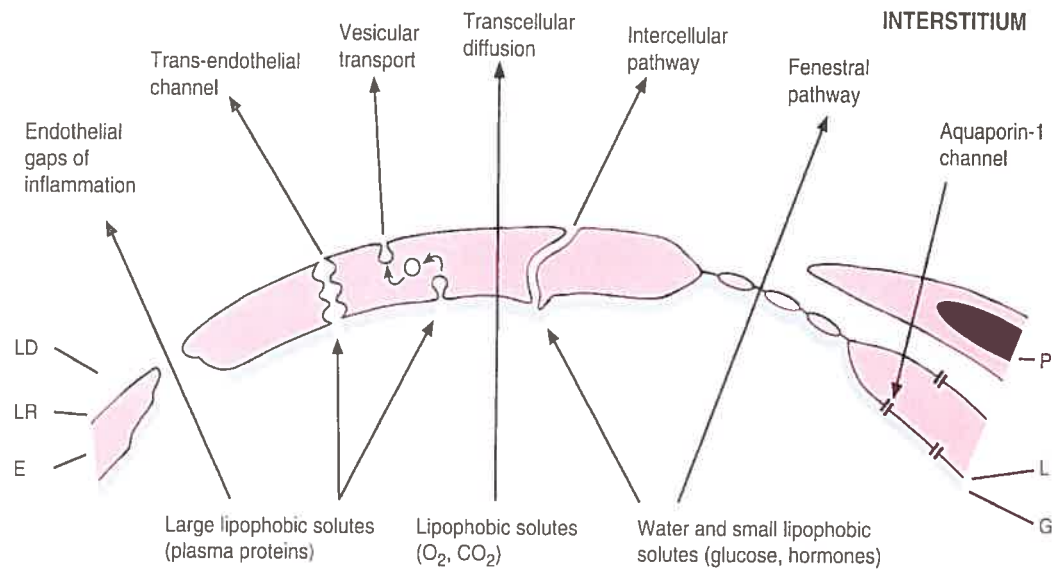


Figure 11: Différents mécanismes d'échanges transcapillaires. E, Endothelium, G, Glycocalyx, L, membrane plasmique lipidique, LR et LD, Lamina Rara et Lamina densa, P, pericyte¹⁴⁹

1.7.1.3 Mécanisme de diffusion tissulaire

La loi de base qui gouverne le phénomène de diffusion passive a été émise par Adolf Fick en 1855. Cette loi stipule que la masse d'un soluté transféré par unité de temps, J_s , dépend de 4 facteurs: la différence de concentration qui guide la diffusion (ΔC), la distance de diffusion (Δx), la surface d'échange capillaire (A) et le coefficient de diffusion D .¹⁴⁹ La vitesse de diffusion est définie par l'équation suivante:

$$J_s = -DA \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (1)$$

Le coefficient de diffusion D est inversement proportionnel à la taille du soluté. Le signe négatif dénote que le transport suit un gradient de concentration.

Dans le but de simplifier l'équation de Fick ci-dessus pour les systèmes *in vivo*, le terme perméabilité de surface (PS) regroupant les constantes D , A et Δx a été défini:¹⁴⁹

$$J_s = PS\Delta C \quad (2)$$

1.7.1.4 Facteurs influençant les échanges transcapillaires

La perméabilité capillaire ne dépend pas uniquement de la géométrie du pore mais également des propriétés du soluté telles que sa taille, son coefficient de partage et sa lipophilie.

Comme la perméabilité capillaire peut être reliée à l'aire des pores présents au sein des différents endothéliums, la taille et la forme des molécules vont influencer leur diffusion à travers les pores.¹⁶⁷ Pour une série de solutés dont le rayon des particules les constituant varie de 0.38-8 nm, il a été démontré *in vitro* qu'une augmentation du rayon du soluté était associée à une diminution de leur perméabilité à travers un endothélium dont la taille moyenne des rayons des pores se situe autour de 8.1 nm.¹⁶⁷ Des pores de cette taille sont analogues à ceux qu'on retrouve au niveau des capillaires cérébraux. Au niveau des endothéliums périphériques, i.e. là où ont lieu la

majorité des échanges pour les BNM, le rayon des pores serait plus grand (20 à 60 nm).¹⁶⁷

Les coefficients de partage huile/eau ont été proposés comme mesure de la lipohilicité/hydrosolubilité des molécules.¹⁶⁸ Par définition, la diffusion passive selon la loi de Fick dépend du coefficient de partage du soluté. La perméabilité endothéliale augmente proportionnellement au coefficient de partage huile/eau. Aussi, à partir d'un certain seuil de lipophilie, la diffusion passive par passage transcellulaire serait favorisée et gagnerait en importance avec une augmentation de lipophilie.¹⁶⁷

Le degré d'équilibre entre le plasma et le liquide interstitiel dépend non seulement de la perméabilité capillaire mais aussi du temps de transit dans le capillaire, qui dépend du débit sanguin (Q).¹⁴⁹ La relation exacte entre PS/Q et l'échange de soluté (E) a été proposée par Renkin:¹⁶⁹

$$E = 1 - \text{Exp}\left(\frac{-PS}{Q}\right) \quad (3)$$

Le rapport PS/Q déterminera le processus d'échange transcapillaire.

Lorsque la perméabilité endothéliale est faible, le transfert du soluté n'est pas limité au débit sanguin mais à la perméabilité endothéliale. Dans ce cas, la concentration plasmatique du soluté ne s'équilibre pas avec l'interstitium avant la fin du capillaire. Ce cas d'échange est observé pour les solutés hydrophiles de tailles moyennes à larges.

Si la perméabilité endothéliale excède le débit sanguin, l'équilibre avec le liquide interstitiel péri-capillaire est atteint rapidement avant la fin du capillaire. Dans ce cas, le facteur limitant de l'échange transcapillaire est le débit sanguin. C'est en général le cas des solutés lipophiles, des petits solutés hydrophiles qui passent à travers les capillaires fenêtrés.

Dans un modèle d'échange capillaire dépendant du débit, la clairance du soluté (CL) représentée par l'équation (4) est une mesure du débit sanguin et non de la capacité de diffusion capillaire.

$$CL = Q[1 - \text{Exp}(\frac{-PS}{Q})] \quad (4)$$

Etant donné que seules les molécules libres pourraient diffuser à travers le capillaire, la liaison aux protéines aurait un rôle à jouer dans la vitesse de diffusion. En effet, la diffusion tissulaire dépend du produit de la perméabilité capillaire intrinsèque (PS) et de la fraction libre circulante du soluté. On a souvent considéré que la diffusion tissulaire des antibiotiques était dépendante du débit sanguin circulant étant donné la perméabilité capillaire élevée. Le fait que ces molécules soient très liées aux protéines plasmatiques, il est plus probable que la diffusion tissulaire serait fonction de la perméabilité capillaire et non du débit sanguin circulant.¹⁷⁰

1.7.2 Technique de microdialyse

La détermination des concentrations tissulaires des médicaments par analyse de tissu entier est utilisée en pharmacocinétique.¹⁷¹ Cette technique, lourde à mettre en œuvre, ne permet qu'une détermination de la quantité totale de médicament au sein du tissu d'intérêt sans permettre de distinguer la fraction libre et présumée active de la fraction liée du médicament. De plus, elle ne permet pas la répétition des prélèvements et exige un nombre élevé d'animaux pour établir le profil d'évolution de la concentration tissulaire d'une substance médicamenteuse en fonction du temps.

L'émergence de la microdialyse a apporté une nouvelle dimension à l'étude de la distribution des médicaments en permettant de suivre en continu l'évolution des concentrations libres au sein du tissu cible. Elle représente une percée dans le domaine de la pharmacologie puisqu'on a pensé pendant longtemps que la biophase ou le site d'action des médicaments est un milieu inaccessible dans les systèmes vivants. Suivre les concentrations au niveau du compartiment effet dans les tissus cibles permet le développement de modèles pharmacocinétiques et pharmacodynamiques plus appropriés comparativement à la détermination indirecte des concentrations tissulaires à partir des concentrations plasmatiques, traditionnellement utilisées.¹⁷²⁻¹⁷⁸

1.7.2.1 Principe de microdialyse

Il s'agit d'une diffusion passive simple des molécules au travers d'une membrane semi-perméable. Sa réalisation exige l'utilisation de sondes particulières dont l'extrémité est équipée d'une membrane de dialyse. Après implantation, ces sondes peuvent être assimilées à des vaisseaux sanguins dans lesquels, ou à partir desquels, diffusent de manière passive les molécules.

Une solution aqueuse de perfusion nommée perfusat est pompée à faible débit vers la sonde. Alors que cette solution mime la composition ionique du liquide extracellulaire, seules les molécules de faible poids moléculaire diffusent dans le sens d'un gradient de concentration autour de la sonde. Elles sont collectées à la sortie pour être analysées (dialysat).

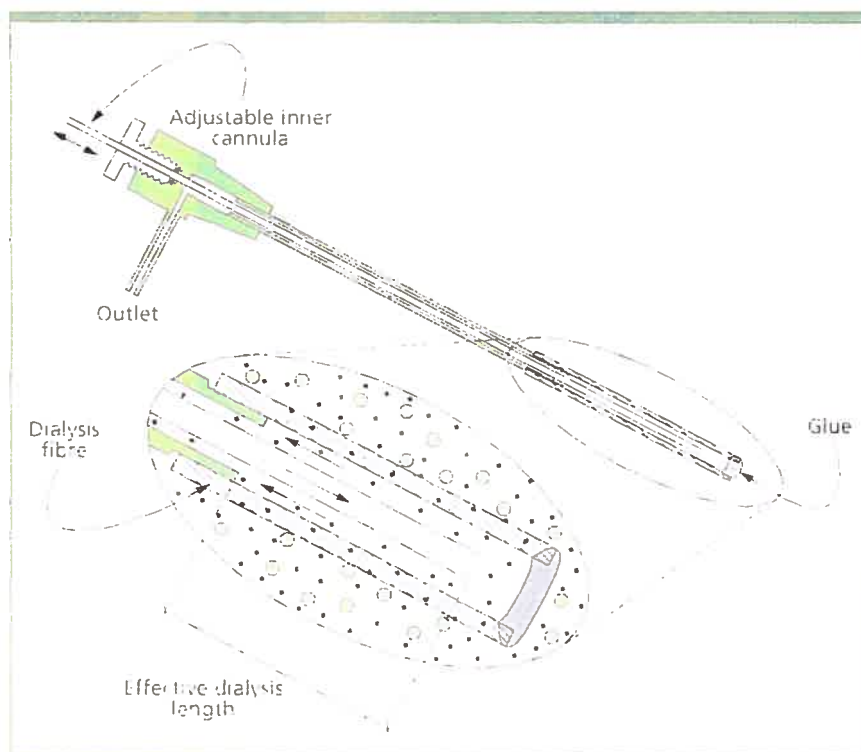


Figure 12: Schéma d'une sonde de microdialyse du type concentrique

1.7.2.2 Paramètres expérimentaux affectant la détermination de la concentration des xénobiotiques

1.7.2.2.1 Le liquide de perfusion

Sa composition doit être la plus proche possible de celle du liquide extracellulaire du tissu étudié.^{176,179} Le liquide de perfusion doit être iso-osmotique afin de limiter les risques d'altérer le tissu et de modifier la concentration des molécules endogènes ou exogènes au site de dialyse.^{179,180} C'est ainsi qu'un liquide de perfusion hypotonique peut augmenter fortement les concentrations de certaines molécules médicamenteuses dans le tissu cérébral et musculaire.¹⁸¹ La composition du liquide de perfusion doit également tenir compte de la molécule étudiée afin d'éviter une diffusion anormale du composé d'intérêt s'il est présent au site de dialyse. Une telle situation a été, par exemple, rapportée lors de l'étude des variations des concentrations de calcium au sein de tissus dialysés avec un liquide de perfusion exempt de calcium.¹⁸² Dans ces circonstances, la déplétion du milieu extracellulaire en calcium cause la diminution des concentrations de différents neurotransmetteurs dans le dialysat.^{183,184}

Le pH du liquide de perfusion doit être identique à celui du compartiment extracellulaire dialysé pour éviter de modifier l'homéostasie du tissu.^{176,179} Une modification du pH local est susceptible, en effet, d'entraîner l'ionisation de la molécule étudiée, une modification locale de la conformation des protéines impliquées dans la fixation de la substance médicamenteuse et une altération des potentiels locaux pouvant modifier la sécrétion locale des cellules.¹⁸⁵

La température du liquide de perfusion pourrait, selon les études, affecter la valeur des concentrations mesurées puisqu'elle affecte les coefficients de diffusion des molécules.¹⁷⁶ Ainsi, le rendement de dialyse *in vitro* de l'acide 3, 4-dihydrophénylacétique à +23°C est augmenté de 30% lorsque la température atteint +37° C.¹⁸⁶ Cependant, les résultats obtenus *in vivo* pour le paracétamol n'ont montré aucun effet de la température du liquide de dialyse sur les concentrations de ce composé mesurées dans le cerveau de rat. Il est à noter qu'un effet de la température a toutefois été observé dans la même étude mais uniquement lorsqu'un liquide de dialyse hypotonique était utilisé.¹⁸⁷

Le débit de perfusion peut varier de 0,5 et 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, fourchette de valeurs pour laquelle la surpression au niveau de la sonde n'entraîne pas la formation d'exsudat ou la rupture de la membrane.^{176,179,188} Comme il s'agit d'un facteur dont dépend le rendement de la dialyse et les volumes de dialysat recueillis, le choix du débit de perfusion résulte d'un compromis entre l'obtention d'un rendement *in vivo* optimal, le volume nécessaire à l'analyse et la fréquence d'échantillonnage requise pour l'étude.¹⁸⁹ Il a été démontré que le rendement de la sonde est inversement proportionnel au débit de sa perfusion.^{176,179,190} En effet, un débit de perfusion élevé résulte en une augmentation de la pression du fluide autour de la sonde, limitant ainsi la diffusion libre des molécules.

1.7.2.2.2 L'intégrité du tissu

Si petit que puisse être le diamètre des sondes utilisées, leur implantation crée inévitablement un traumatisme entraînant des modifications tissulaires au site de dialyse. Toutefois, ces modifications seraient de faible importance comme en témoigne la similitude des résultats obtenus lors de la comparaison du passage intracérébral de l'aténolol évalué par microdialyse et par des techniques d'imagerie¹⁸⁷. De plus, les modifications observées sur les concentrations de la molécule étudiée ne seraient plus significatives 30 min après la mise en place de la sonde tant au niveau tissulaire¹⁹¹ que sanguin.^{182,189} En d'autres termes, le respect d'un délai d'environ 30 à 45 min après implantation de la sonde de dialyse avant de commencer les investigations devrait minimiser, voire supprimer, d'éventuels artéfacts.

1.7.2.2.3 Rendement de la dialyse

La technique de microdialyse n'est pas typiquement réalisée sous des conditions d'équilibre. C'est pour cette raison que la concentration des molécules à la sortie de la sonde ou dialysat reflète seulement une fraction de la concentration libre réelle dans le liquide extracellulaire du tissu cible. La relation entre ces deux concentrations représente l'efficacité d'extraction ou rendement de la sonde de microdialyse.^{172,173,176}

Le rendement absolu ou rendement de masse se définit comme étant la quantité du médicament extraite (ou perdue) par le dialysat en fonction du temps. Le rendement

relatif exprimé en pourcentage (RR %) est le critère le plus utilisé en pratique. Il est défini comme étant la concentration du médicament dans le dialysat (C_{out}) divisée par sa concentration dans le liquide extracellulaire (C_{ECF}). Le rendement de la dialyse *in vivo* est un paramètre de haute importance puisqu'il dicte la concentration du médicament dans le liquide extracellulaire. Il peut être influencé par la température, le débit de perfusion, les propriétés physico-chimiques de la membrane de microdialyse, la géométrie de la sonde, la surface de la membrane et les propriétés du médicament à analyser. La vitesse de diffusion du médicament au sein de la matrice, sa captation par les cellules, la vitesse du métabolisme, le degré de vascularisation des tissus, ainsi que le débit sanguin peuvent affecter localement le rendement de la dialyse.¹⁷³

Dans le but de déterminer le rendement de la dialyse, plusieurs techniques de calibration de la sonde de microdialyse ont été proposées dans la littérature.^{176,179}

1.7.2.3 Calibration *in vitro*

En 1982, Zetterstrom et ses collaborateurs¹⁹² ont été les premiers à utiliser une simple calibration *in vitro* pour déterminer les concentrations interstitielles de purine dans le cerveau de rat. Elle consiste à immerger la membrane de dialyse, continuellement perfusée, dans un milieu aqueux contenant la molécule à étudier (réservoir). Le rendement *in vitro* est le rapport entre la concentration dans le dialysat, C_{out} , et celle dans le réservoir, C_r .

1.7.2.4 Méthode d'extrapolation

En utilisant le concept de clairance à l'état d'équilibre, Deguchi et ses collaborateurs ont extrapolé la concentration de deux antibiotiques dans le dialysat à leurs concentrations dans le liquide interstitiel du tissu. Cette méthode d'extrapolation permet de corriger les différences de perméabilités de la molécule étudiée entre les conditions de microdialyse *in vitro* et *in vivo*. Elle implique l'utilisation d'un composé de référence, dont on assume que le coefficient de diffusion est similaire à celui de la molécule étudiée.¹⁹³

1.7.2.5 Limites de la calibration *in vitro*

Il n'est pas toujours possible d'extrapoler la valeur de calibration *in vitro* aux conditions expérimentales *in vivo* du fait que le rendement de dialyse dépend étroitement du transport de masse au niveau du tissu cible.^{174,194} *In vitro*, le flux est limité par les coefficients de diffusion dans la solution aqueuse et la membrane de microdialyse.¹⁷⁹ Cependant, la diffusion des molécules *in vivo* est contrainte par la fraction de volume représentant le rapport entre l'espace extracellulaire et le volume tissulaire (le liquide extracellulaire représente approximativement 15 à 20 % du volume tissulaire). De plus, le chemin tortueux qu'empruntent les molécules pour diffuser à travers la sonde de microdialyse ralentit, certes leur diffusion. En outre, la microviscosité du liquide extracellulaire est supérieure à celle de l'eau dû à la présence de macromolécules, qui en interagissant avec les molécules du soluté, réduisent la vitesse de transit dans le liquide extracellulaire du tissu.

1.7.2.6 Calibration *in vivo*

La détermination des "vraies" concentrations de la forme libre d'une substance médicamenteuse reste le point faible de la technique de microdialyse. Elle exige, en effet, de connaître le rendement de la dialyse au sein du tissu étudié. S'il a été démontré que l'utilisation du rendement *in vitro* ne peut pas être considérée comme une méthode de référence, la détermination des rendements *in vivo* n'en reste pas moins délicate et sujette à discussion si l'on en juge par le nombre de méthodes actuellement proposées. La méthode du "Zero Flux"^{190,195} et celle du "No Net Flux"^{196,197} exigent d'atteindre un état d'équilibre, ce qui rend leur mise en œuvre longue et difficile.

1.7.2.6.1 Méthode du "Zero Flux" ou perfusion à faible débit

Il a été démontré qu'à des faibles débits de perfusion (< 50 nl/min), le rendement de dialyse peut être supérieur à 95 % pour des composés dont le poids moléculaire est inférieur à 500 Da.¹⁷²

La méthode du "Zero Flux" correspond à la mesure des concentrations de la molécule étudiée dans le dialysat (C_{out}) en perfusant la sonde à différents débits (intervalles

habituels) . La concentration réelle dans le liquide extracellulaire (C_{ECF}) pour un débit nul est déterminée par régression non linéaire et correspond à un rendement de 100%. Le désavantage de cette approche est la difficulté de collecter des volumes adéquats pour permettre une analyse quantitative.

1.7.2.6.2 Méthode du "No Net Flux" ou différences des concentrations

La méthode du "*No Net Flux*" a été développée par Lonroth et ses collaborateurs.¹⁹⁸ Après établissement d'un état d'équilibre, elle consiste à perfuser la sonde implantée dans le tissu avec différentes concentrations de la molécule étudiée, puis à déterminer les différences de concentrations entre le perfusé (C_{in}) et le dialysat (C_{out}). La pente de la droite reflétant l'évolution de ces différences en fonction de la concentration du produit perfusé correspond à la valeur du rendement *in vivo*.^{172,173,176}

Le fait de varier les concentrations de la molécule étudiée dans le perfusé (C_{in}), l'ampleur et la direction du gradient de concentration se trouvent modifiées. Lorsque les concentrations dans le perfusé et le tissu sont égales, un état d'équilibre s'installe et il n'y a plus d'échange net entre les deux milieux. C'est le point du *No Net Flux*, représentant la concentration réelle de la molécule dans le liquide extracellulaire du tissu (C_{ECF}).

La méthode du *No Net Flux* est considérée précise puisque la molécule à étudier est elle-même utilisée pour la calibration de la sonde de microdialyse. Cependant, c'est un processus dont la mise en oeuvre est longue et difficile. En outre, la précision de cette méthode dépend étroitement du choix des concentrations préalablement préparées par l'utilisateur ainsi que du nombre de concentrations utilisées. De plus, elle ne permet pas de suivre le rendement de la sonde et les concentrations de la molécule en fonction du temps, ce qui représente l'inconvénient majeur de cette méthode.

Dans le but d'y remédier, Olson et Justice¹⁷⁵ ont élargi la méthode du *No Net Flux* en utilisant une seule concentration de perfusion par groupes d'animaux. Ainsi, différents groupes reçoivent différentes concentrations de soluté et les résultats sont combinés pour chaque temps d'analyse. La régression de la moyenne des données des différents groupes à un point particulier donne la concentration dans le liquide extracellulaire et

le rendement de dialyse au même temps. En utilisant cette méthode, les investigateurs ont montré que la récupération *in vivo* peut changer avec le temps, comme c'est le cas de la dopamine en coadministration avec la cocaïne ou l'amphétamine.¹⁷⁵ Bien que cette approche de calibration soit vigoureuse, l'utilisation d'un nombre important d'animaux limite son utilisation.

1.7.2.6.3 "Reverse Dialysis " ou dialyse inverse

Basée sur une diffusion passive des molécules à travers la membrane de dialyse quel que soit le sens de passage de la molécule, la *méthode de "dialyse inverse" (Reverse Dialysis)* ne nécessite pas l'obtention d'un état d'équilibre.^{172,173,191,199} La molécule étudiée est introduite dans le perfusé et la proportion de médicament perdue dans le tissu, calculée à partir des concentrations dans le dialysat (C_{out}) et le perfusé (C_{in}), détermine la valeur du rendement $R_{in vivo} = (C_{in} - C_{out}) / C_{in}$. En principe, cette calibration est menée avant toute administration du médicament dans l'organisme. Dans ce cas, il faut supposer que le rendement reste inchangé durant toute la période expérimentale.

Cette technique couplée à l'utilisation d'un étalon interne ou calibrateur ajouté au perfusé, ou "*Rétrodialyse" (Retrodialysis)*, permet de contrôler l'évolution du rendement tout au long de l'étude.^{200,201} Bien que séduisante, la limite de cette dernière méthode réside dans le choix du calibrateur qui doit posséder les mêmes caractéristiques physico-chimiques que la molécule étudiée sans toutefois induire d'interactions d'ordre pharmacologique et/ou pharmacocinétique. Pour appliquer cette technique, il faut vérifier si les caractéristiques de diffusion des deux molécules sont similaires *in vivo*.²⁰²

En pratique, cette technique de calibration est réalisée en trois étapes:²⁰⁰

Période de référence: Elle précède l'administration systémique de la molécule à étudier. Le calibrateur et le médicament lui-même sont ajoutés au liquide de perfusion et leurs pertes relatives sont déterminées et reliées par un rapport k . Cette étape permet de vérifier d'une part, si les deux molécules ont les mêmes propriétés de diffusion *in vivo* et d'autre part, si des interactions existent entre le calibrateur et le médicament dans le tissu.

Période de rinçage: Elle permet de s'assurer qu'il n'y a plus de résidus de médicament dans la sonde de microdialyse avant administration systémique de ce dernier. La sonde doit donc être perfusée avec le calibrateur seul pendant un certain temps.

Période expérimentale: Elle consiste à administrer le médicament dans l'organisme et à mesurer sa concentration dans le dialysat. Pendant ce temps, seulement le calibrateur est présent dans le liquide de perfusion. Sa perte est alors déterminée pour chaque temps et considérée représentative du rendement de dialyse pour le même intervalle de temps.

1.7.2.7 Aspect analytique

L'absence de macromolécules protéiques, d'enzymes de dégradation et de microorganismes au sein des dialysats permet d'analyser ces derniers sans procédure d'extraction ou de purification préalable, voire dans certains cas de pouvoir pratiquer une analyse en temps réel ("on line"). Cependant, l'application de la microdialyse à l'étude pharmacocinétique de substances médicamenteuses reste encore limitée aux performances des techniques analytiques actuellement disponibles. Il s'agit, en effet, de mesurer le plus souvent de faibles concentrations de médicament présentes dans le liquide extracellulaire (fraction libre) dont seule une faible proportion de la quantité présente est retrouvée dans le dialysat (faible rendement de dialyse) et dans des échantillons de petit volume.

1.7.2.8 Avantages

- Les progrès réalisés dans la géométrie et la miniaturisation des sondes autorisent leur implantation sans anesthésie chez des espèces de petite taille, comme la souris, et dans la quasi totalité des tissus de l'organisme.^{203,204}
- Les profils d'évolution des concentrations d'une substance endogène ou d'un xénobiotique en fonction du temps peuvent être déterminés chez le même animal minimisant ainsi les variations inter-individuelles.

- Les concentrations mesurées dans les dialysats correspondent à celles de la forme libre du médicament, considérée comme seule diffusible et active, présente dans le liquide extracellulaire du tissu cible.
- L'implantation de plusieurs sondes chez un même animal permet de réaliser la cinétique d'une molécule simultanément dans différents tissus.
- Ces avantages associés à un coût relativement peu élevé comparativement aux autres techniques susceptibles d'être mises en œuvre font de la microdialyse une technique de choix en pharmacocinétique.

1.7.2.9 Inconvénients

Comme pour toute technique, un certain nombre de facteurs en limite son application :

- La détermination des rendements *in vivo* reste délicate et l'ensemble des paramètres pouvant influencer leur détermination sont loin d'être encore tous connus et parfaitement maîtrisés.
- L'analyse des échantillons obtenus reste un point clé et conditionne le plus souvent la mise en œuvre de cette technique pour l'étude cinétique d'une molécule donnée.
- L'application de la microdialyse à l'étude des macromolécules reste difficile en raison de la formation d'exudat observée avec des membranes à "cut-off" élevé.

1.7.3 Applications de la microdialyse dans les tissus périphériques

Si les premières applications de la microdialyse à l'étude de la pharmacocinétique du médicament ont été publiées il y a une quinzaine d'années⁷⁷, ce n'est que plus récemment encore que cette technique a été appliquée à l'étude de la distribution des

médicaments dans les tissus périphériques. En dépit des potentialités de cette technique, les études réalisées restent encore très ponctuelles et les résultats obtenus d'une synthèse difficile.

Dans le muscle, la microdialyse a été utilisée avec succès pour étudier la pénétration et la distribution des antibiotiques tels que les β lactamines et les macrolides,^{193,205,206} de la L-Dopa^{207,208} et de la gallamine²⁰⁹ chez différentes espèces animales telles que le rat et le chien. Dans le tissu cardiaque, la microdialyse a été utilisée pour mesurer les concentrations libres de propranolol dans le ventricule gauche du cochon anesthésié²¹⁰. Elle a été également employée pour étudier la distribution des agents de contraste dans le tissu myocardique ischémique ou non-ischémique de cochon.^{211,212} Dans le tissu pulmonaire, les concentrations de théophylline ont été mesurées par microdialyse chez le rat.²¹³ Cette technique a été également appliquée pour établir la cinétique intrabronchique de la tobramycine et la gentamicine chez le rat anesthésié.²¹⁴ Dans le tissu rénal, la microdialyse a été utilisée pour examiner la production d'oxyde nitrique (NO) et de ses métabolites dans le cortex rénal et la médulla.²¹⁵

Dans le tissu hépatique, un changement du rendement de la phénacétine et de l'antipyrine à travers la sonde de microdialyse a été estimé en évaluant l'impact de l'inhibition des processus métaboliques chez le rat.²¹⁶ Dans le pancréas, la microdialyse a servi pour évaluer le rôle du NO dans l'adhérence des leucocytes dans la microcirculation pancréatique après induction d'une pancréatite aiguë.²¹⁷

La microdialyse a également permis d'étudier la distribution extracellulaire des médicaments dans le tissu cutané²¹⁸, oculaire²¹⁹, le système reproducteur²²⁰ et les muqueuses.²²¹

1.7.3.1 Applications cliniques de la microdialyse

La première application de microdialyse chez l'homme en 1987 concernait les concentrations interstitielles de glucose dans le muscle¹⁹⁸ et son utilisation était adaptée plus tard au tissu adipeux.²²² Depuis, la microdialyse a été appliquée dans plusieurs tissus de l'organisme humain tels que le cerveau, le coeur, les poumons et les tumeurs solides.²²³⁻²²⁶

Récemment, la microdialyse a trouvé ses applications dans les domaines de la recherche clinique. C'est un outil qui permet de déceler une ischémie secondaire à un traumatisme crânien ou à une hémorragie intracrâniale en révélant des changements caractéristiques des concentrations de certains métabolites énergétiques tels que le glycérol, les lactates et les pyruvates.²²⁷ Cette technique permet également de déterminer les concentrations des transaminases cardiaques suivant une intervention chirurgicale.²²⁴ Elle offre également la possibilité de mesurer de manière continue le taux de glucose tissulaire chez certains diabétiques afin d'améliorer le contrôle métabolique.²²⁸

En pharmacologie clinique, la microdialyse permet d'expliquer certains échecs thérapeutiques dans le domaine des antibiotiques ainsi que certaines résistances bactériennes.²²⁹ Elle serait un outil d'évaluation de la pénétration optimale des médicaments à travers la barrière hémato-encéphalique chez les patients atteints du SIDA.²³⁰

A la lumière des développements prometteurs de la technique de microdialyse, il est très probable que celle-ci devienne un outil de diagnostic dans plusieurs applications cliniques. Elle deviendrait une partie intégrale dans les unités de soins intensives et probablement un outil standard dans les études d'ADME au stade du développement du médicament.

2 Récapitulatif et objectifs

On peut constater à la lecture de cette revue de littérature que le mivacurium est un BNM non dépolarisant qui subit une hydrolyse indépendante des organes, par la cholinestérase plasmatique. En se basant sur des travaux antérieurs, nous avons constaté que le mivacurium avait un très faible volume de distribution (équivalent tout au plus au volume vasculaire) lorsqu'on utilisait un modèle pharmacocinétique traditionnel, sans inclure une constante d'élimination au niveau du compartiment périphérique. Cette sous-estimation du volume de distribution indiquait qu'un modèle avec élimination centrale était inadéquat. Par conséquent, nous avons énoncé l'hypothèse que le mivacurium est hydrolysé dans les tissus périphériques et nous avons entrepris l'évaluation du gradient artérioveineux à l'état d'équilibre chez le patient anesthésié.

Les résultats de cette étude nous ont permis de confirmer que les isomères actifs du mivacurium sont hydrolysés dans le muscle, qui représente le site d'action. Sachant que le mivacurium est un ammonium quaternaire qui se distribue exclusivement dans le liquide extracellulaire, nous avons émis notre deuxième hypothèse: le mivacurium peut être hydrolysé dans le liquide interstitiel du muscle. Pour le démontrer, nous avons décidé de quantifier la concentration du mivacurium dans le liquide interstitiel par microdialyse. Cette information s'avérerait d'une importance inestimable d'une part, pour proposer un facteur de correction pour les concentrations dans la biophase, et d'autre part, pour valider les modèles pharmacocinétiques paramétriques.

Pour être quantitative, la technique de microdialyse requiert une méthode de calibration adéquate. Pour cela, nous avons décidé de valider cette technique chez un modèle animal en utilisant un BNM dont la distribution est exclusive au liquide interstitiel et l'élimination dépend des organes centraux, le rocuronium. Nous avons opté pour le chien comme modèle animal étant donné que l'activité de la cholinestérase plasmatique est élevée par rapport à d'autres espèces animales.

Dans le but de quantifier les concentrations interstitielles du rocuronium et du mivacurium, nous avons appliqué la technique de microdialyse chez le chien

anesthésié. La mesure quantitative des concentrations périphériques ou effet des BNM dans la biophase n'a jamais été réalisée auparavant. Nous avons également voulu caractériser la relation concentration-effet du mivacurium afin de mieux comprendre l'impact de l'élimination périphérique sur les paramètres pharmacocinétiques et la relation concentration-effet.

Les objectifs spécifiques de ce travail sont:

- Déterminer le gradient artério-veineux du mivacurium à l'équilibre chez le patient anesthésié
- Évaluer la faisabilité et la fiabilité de la technique de microdialyse dans un modèle animal en mesurant les concentrations interstitielles musculaires d'un BNM dont l'élimination se fait uniquement dans le compartiment central tel que le rocuronium (contrôle négatif).
- Évaluer la concentration interstitielle du mivacurium par microdialyse chez un modèle animal et établir la relation concentration-effet du mivacurium en tenant compte de l'élimination périphérique (si confirmée).

3 Publications

Article 1: Mivacurium Arteriovenous Gradient during Steady State Infusion in Anesthetized Patients. Published. *Anesthesiology*.97: 622-629, 2002

Article 2: Determination of Interstitial Rocuronium Concentrations in the Muscle Tissue of Anesthetized Dogs by Microdialysis. Published. *Journal of pharmacological and toxicological methods*.49 (2) : 121-9, 2004

Article 3: Muscle Concentrations of Rocuronium under Steady State Conditions in Anesthetized dogs: Actual versus Predicted Concentrations. *British journal of anaesthesia (2004)*. *In press*.

Article 4: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relation of Mivacurium in Anesthetized dogs (*in preparation*)

3.1 Mivacurium Arteriovenous Gradient During Steady State Infusion in Anesthetized Patients

Samia Ezzine, D.Pharm, M.Sc¹, François Donati, Ph.D, MD, FRCPC², France Varin, B.Pharm, Ph. D³

Correspondence should be addressed to:

D^r France Varin
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
2900 boul.Edouard Monpetit
C.P 6128, Succursale Centre-ville
Montréal (Québec)
H3C 3J7
Canada

Tel: 514-343-7016, Fax: 514-343-5735

The work was performed at the Faculté de Pharmacie, Université de Montréal and Département d'Anesthésie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

¹ Ph.D student, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

² Professor, Département d'anesthésie, Faculté de médecine, Université de Montréal.

³ Professor, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

Funding: This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant MA-10274). A Canadian Institutes of Health Research - Research and development studentship was awarded to Samia Ezzine.

Presented in part at the Annual Meeting of The American Society of Anesthesiologists in New Orleans, Louisiana, United States. October 14-17, 2001.

Acknowledgment: The authors would like to thank Ms Johanne Couture, R.T., faculté de pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada, for her collaboration in this study.

Abbreviated title: Arteriovenous gradient of mivacurium in humans

Summary Statement: During steady state infusion of mivacurium, the arterial concentrations of the rapidly hydrolyzed isomers is 30-40% higher than the venous concentrations, while there is no difference in the *cis cis* isomer concentrations. This profoundly affects the calculated pharmacokinetic and pharmacodynamic variables.

ABSTRACT

Background: Mivacurium *cis trans* and *trans trans* isomers undergo rapid hydrolysis by plasma cholinesterase. As this enzyme is largely distributed, it cannot be excluded that these isomers might undergo peripheral elimination. This hypothesis was investigated in patients by measuring the difference between arterial and venous concentrations under a constant-rate continuous infusion of mivacurium.

Methods: During propofol-remifentanil anesthesia, eight adult consenting patients received an iv bolus of mivacurium $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, followed by a constant infusion (3, 5 or $7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) into the brachial vein. One hour after starting the infusion, arterial (radial artery) and venous (contralateral brachial vein) blood samples were drawn simultaneously at 15 min intervals for 45 min. Mivacurium isomers and metabolite plasma concentrations were determined by stereospecific high performance liquid chromatography. Using the corresponding arterial and venous concentrations, the tissue extraction coefficient as well as total body clearance were calculated.

Results: Under steady state conditions, the venous concentrations of the *trans trans* and *cis trans* isomers were $34 \pm 13\%$ and $42 \pm 11\%$ (mean \pm SD) lower than the corresponding arterial concentrations ($P < 0.05$), respectively. For the *cis cis* isomer, the difference in venous and arterial concentrations was $3 \pm 4\%$ ($P = 0.063$). Total body clearances of the *trans trans* and *cis trans* isomers were greater when based on venous sampling ($P < 0.05$).

Conclusion: Pharmacokinetic parameters derived from a constant infusion of mivacurium depend heavily on the sampling site (arterial or venous) for the rapidly hydrolyzed isomers. These results strongly suggest a significant metabolism of mivacurium within muscle tissue that may account for the large interpatient variability in response to mivacurium.

INTRODUCTION

Pharmacokinetic studies dealing with mivacurium indicate that the active isomers *trans trans* (57 % w/w) and *cis trans* (36 % w/w) have a rapid half-life, less than 3 minutes, while the *cis cis* isomer (6%) has a 30 minute half-life.¹⁻³ An ester linkage renders this member of the benzylisoquinolinium family susceptible to metabolism by plasma cholinesterase (pseudocholinesterase or butyrylcholinesterase), resulting in extremely rapid clearance from the systemic circulation.⁴ This enzymatic metabolism pertains to the two active isomers of mivacurium but not to the less potent one, *cis cis* mivacurium, since it is eliminated by several pathways of which cholinesterase metabolism represents but one (perhaps minor) component.^{5,6} Mivacurium hydrolysis produces two types of inactive metabolites namely the quaternary amino alcohols (*cis and trans*) and the quaternary monoesters (*cis and trans*). The latter may, in turn, undergo further hydrolysis into their respective alcohols.⁷

Plasma cholinesterase is distributed throughout the body, particularly in the liver, lung, intestines, muscle,⁸ and end-plate (mice).⁹ The enzyme is not necessarily localized intracellularly since it has recently been shown to be present in the cerebrospinal fluid of monkeys and pigs.¹⁰ Mivacurium, whose distribution is mainly extracellular, may therefore undergo peripheral elimination in muscle tissue which represents the effect compartment. Accordingly, as mivacurium transits from an arterial to a venous site across the forearm, hydrolysis by plasma cholinesterase may occur not only within the vascular space but also in the extravascular space. We therefore hypothesized that a large difference would exist between arterial and venous concentrations of mivacurium under steady state conditions for the rapidly hydrolyzed isomers, but not for the *cis cis* isomer. This, in turn, would imply that the derived pharmacokinetic (PK) and also pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) parameters for the rapidly hydrolyzed isomers would depend on sampling site.

The purpose of this study was to investigate whether mivacurium undergoes peripheral elimination in muscle. The arteriovenous gradient of mivacurium was measured in the forearm under steady state conditions in anesthetized patients undergoing elective surgery.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The three isomers of mivacurium chloride, the monoester and quaternary alcohol metabolites as well as laudanidine were kindly supplied by Glaxo Wellcome (Stevenage, Hertfordshire, United Kingdom). All organic solvents were HPLC grade (Anachemia, Montreal, Québec, Canada).

Clinical Protocol

The study protocol was approved by the Ethics Review Board of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and all participants gave informed written consent before participating in the study. Eight adult patients classified as American Society of Anesthesiologists physical status I or II and scheduled to undergo elective surgery in which the insertion of an arterial cannula was indicated were recruited for the study. Patients were 20-65 years old and within 30 % of their ideal body weight. Those with cardiovascular, pulmonary, psychiatric, neurologic or neuromuscular disease as well as significant renal or liver impairment were excluded. A history of malignant hyperthermia, unusual sensitivity to neuromuscular blocking agents or intake of medications known or suspected to affect neuromuscular function constituted additional exclusion criteria.

Monitoring included electrocardiography, continuous blood pressure determination and pulse oximetry. Inspired and expired carbon dioxide, oxygen, and nitrous oxide concentrations were also monitored. Anesthesia was induced with remifentanyl ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), propofol ($1.5 - 2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and mivacurium ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and maintained with propofol ($80 - 150 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), remifentanyl ($0.1 - 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), and nitrous oxide 70% in oxygen. The trachea was intubated and mechanical ventilation was adjusted to maintain normal end-tidal CO_2 . For neuromuscular monitoring, the ulnar nerve was stimulated supramaximally at the wrist using the train-of-four pattern (2 Hz for 2 s) every 15 s. The response of the adductor pollicis muscle was recorded by accelerometry. A catheter was inserted into the brachial (the

antecubital fossa) vein and used for injection of drugs and fluid replacement. On the same arm, the radial artery was used for arterial blood sampling while a catheter was placed in the brachial vein of the contralateral arm for venous blood sampling.

Mivacurium chloride (Mivacron[®], Abbott laboratories, Saint-Laurent, Québec, Canada) was supplied in vials, each ml containing the equivalent of 2 mg of mivacurium. Patients received an iv bolus of 0.2 mg . kg⁻¹. After recovery of at least one twitch in the train-of-four, an infusion rate that would keep the first twitch (T1) within 5 - 15 % of the control value was chosen for each patient. This was achieved with constant infusion rates of 3 (n = 1) , 5 (n = 4) and 7 (n = 3) µg . kg⁻¹. min⁻¹. Arterial and venous blood samples (3 ml) were drawn prior to drug administration, one hour after starting the infusion and 15, 30 and 45 minutes thereafter. Blood samples were collected simultaneously into heparin-prepared Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada) containing 0.1 mg ecothiophate to inhibit degradation of mivacurium and kept on ice until centrifugation at 1,600 g for 5 minutes. The decanted plasma was stored at -70°C until analysis.

Analytical Method

Plasma concentrations of mivacurium isomers and metabolites were determined simultaneously using a specific high-performance liquid chromatography (HPLC) assay coupled with fluorescence detection. This method was adapted from that previously reported for cisatracurium and its metabolites in human urine.¹¹ The lower limit of quantification of the assay was 4.9 ng/ml. The assay was linear up to 2500 ng/ml for mivacurium isomers and up to 6000 ng/ ml for the metabolites. The method proved to be reproducible for each analyte with within and between assay coefficients of variation of less than 10% over the linear range.

Parameter Calculation

All arterial and venous plasma samples were analyzed in duplicate. As the difference between duplicate analyses was less than 10 %, the mean of the two values was used. In order to verify that each patient was studied under steady state conditions, arterial

and venous plasma concentrations obtained at different times during the 45 min collection period following the 1 hour-infusion were compared using the Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. After statistical confirmation of steady state conditions, the arterial concentrations obtained at each collection time in a given patient were pooled and averaged. Venous samples were treated similarly. For each patient, the arteriovenous extraction ratio (E) of mivacurium was then calculated by using the mean arterial ($C_{p_{ssa}}$) and venous ($C_{p_{ssv}}$) steady state plasma concentrations in the following formula:

$$E(\%) = \frac{C_{p_{ssa}} - C_{p_{ssv}}}{C_{p_{ssa}}} \times 100$$

Because of the large range of infusion rates used in patients ($3 - 7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) and to allow for parameter calculations, the plasma concentration for each isomer was normalized to an infusion rate of $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ of mivacurium. The infusion rate was corrected for the percentage of each isomer in the racemic mixture. Then, the corresponding total body clearance (CL) was estimated by dividing the infusion rate (k_{01}) by either the mean arterial or venous steady state concentration.

Statistical Analysis

Data are represented as mean values \pm SD. For each patient, a Wilcoxon Signed rank test was used to compare arterial and venous parameters. The threshold for statistical significance (α) was set to 0.05.

RESULTS

The 6 male and 2 female patients had a mean age of 52 ± 18 yr, mean height of 175 ± 12 cm and mean weight of 85 ± 12 kg, corresponding to a mean body mass index of 27. Patients were scheduled for total hip replacement ($n = 3$), discectomy ($n = 3$) and total knee replacement ($n = 2$). The infusion rate was not altered and neuromuscular recordings remained stable for at least one hour prior to and during the sampling period.

One hour after starting mivacurium infusion, arterial concentrations for the *trans trans* and *cis trans* isomers were stable in all patients during the sampling period (Figure 1). Therefore, steady state was considered to be achieved. Venous concentrations were found to be consistently lower than their corresponding arterial concentrations (Table 1). For the *trans trans* isomer, mean venous steady state concentrations amounted to 66 ± 13 % of the mean arterial concentrations ($P = 0.008$), representing a 34% gradient across the forearm (Table 1 and Figure 2A).

The estimated total body clearance was different depending on the sampling site. The clearance calculated using venous concentrations was 60% higher than that calculated using arterial concentrations ($P = 0.008$). For the *cis trans* isomer (Table 2 and in Figure 2B), mean venous steady state concentrations represented 58 ± 11 % of the mean arterial concentrations, corresponding to an arteriovenous gradient of 42% across the forearm ($P = 0.008$). The estimated clearance was 1.9 fold higher when calculated using mean venous concentrations ($P = 0.004$).

Steady state concentrations were reached for the *cis cis* isomer in all patients except in patient 3, for whom we retained only the last-period arterial and venous concentrations. Arterial and venous concentrations for the *cis cis* isomer were virtually identical ($P = 0.063$) (Table 1 and Figure 2C), with no difference in clearance estimates.

In Table 2, arterial and venous plasma steady state concentrations for mivacurium metabolites are presented for 7 patients only, due to insufficient volume of blood

samples from patient 3. There were no significant arteriovenous differences for the *cis* monoester ($P = 0.144$), *trans* monoester ($P = 0.640$), *cis* alcohol ($P = 0.080$) and *trans* alcohol ($P = 0.958$) metabolites of mivacurium.

DISCUSSION

This study reveals an important arteriovenous gradient for the two rapidly hydrolyzed isomers of mivacurium during constant intravenous infusion of the drug in humans, suggesting a high extraction across the forearm. In contrast, no extraction was observed for the less potent *cis cis* isomer. Assuming that the three isomers of mivacurium have similar physicochemical properties, the arteriovenous concentration difference observed for the *cis trans* and *trans trans* isomers would result from intravascular degradation and/or tissue hydrolysis in the forearm.

In our study, particular attention was paid to the experimental design in order to reach steady state conditions and minimize *ex vivo* degradation of mivacurium. Steady state conditions were ensured by allowing a long time of equilibration (one hour) before drawing the first samples. The infusion rate was not altered during that time and twitch response remained stable throughout. No inhalational agents, which might have potentiated the blockade, were given. The lack of significant variation of mivacurium concentrations over time in a given patient confirmed that steady state was achieved. Dead space was minimized in the intravenous tubing by infusing or collecting the drug as close as possible to the intravenous or arterial access site. Blood was drawn from both sites at approximately the same speed and the transfer of blood into ecothiophate-containing tubes was completed within 5 seconds. As withdrawing blood (and drug) from the arterial circulation might have affected venous levels, arterial and venous samples were drawn from different arms. We therefore assumed that the arterial concentrations in both arms were identical.

Under steady state conditions, no difference should be measured between the arterial and venous concentrations of a drug across an organ that is not involved in its metabolism or elimination, since net tissue uptake is zero.¹² This was confirmed in the present study for the *cis cis* isomer of mivacurium, where only a 3 % arteriovenous difference was found across the forearm. Conversely, we found that the forearm venous concentrations of the *trans trans* and *cis trans* isomers were almost 2-fold lower than their corresponding arterial concentrations. This is consistent with published data demonstrating that the elimination of *cis trans* and *trans trans* mivacurium

depends largely on plasma cholinesterase while the *cis cis* isomer is eliminated mainly by renal excretion.⁶

Mivacurium is the first neuromuscular blocking agent for which an arteriovenous gradient is established during constant intravenous infusion. Similar findings have been observed for other short acting ester-containing compounds largely distributed throughout the body.¹³⁻¹⁶ This arteriovenous difference was attributed to an irreversible loss of the drug as it passes through the microcirculation of the forearm, most probably due to rapid elimination by tissue esterases. For mivacurium, the arteriovenous gradient may result from intravascular degradation and/or tissue hydrolysis in the forearm but the exact localization of the enzyme remains to be clarified. As mivacurium, a bi-quaternary ammonium, is almost exclusively distributed in the extracellular fluid, fat was excluded *a priori* as a potential site of metabolism in the forearm. Connective tissue was also excluded because it represents a very small fraction of the total mass of the forearm and no report indicates butyrylcholinesterase or "plasma cholinesterase" activity. Although, as much as 50-70% of the resting blood flow to the forearm goes to the skeletal muscle in conscious humans¹⁷, muscle is made up of 1 % blood only¹⁸. If one assumes that the average blood flow in the forearm of anesthetized patients¹⁹ is $27 \text{ ml} \cdot \text{kg tissue}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, venous concentrations would be expected to lag by only 21 sec. Hence, degradation by plasma cholinesterase may occur within the intravascular space, though to a negligible extent (less than 10% if one assumes an elimination half-life of 2.3 min)². Therefore, extravascular hydrolysis of *cis trans* and *trans trans* mivacurium may contribute to the significant arteriovenous difference of the two active isomers. In view of the extracellular distribution of mivacurium, it would be reasonable to infer that butyrylcholinesterase may be present in the interstitial fluid of the muscle tissue and play an important role in the extravascular hydrolysis of mivacurium.

To estimate the potential contribution of the muscle tissue to the overall elimination of mivacurium, we estimated muscle tissue clearance grossly by multiplying the extraction ratio (E) obtained for each patient by the average muscle blood flow multiplied by 40 % (the percentage of the muscular mass in the body) corrected for plasma fraction (60 %). Under these premises, muscle tissue clearance would represent as much as 16 % of the total body clearance in most patients. Therefore,

although muscle tissue extraction is relatively high for mivacurium (40 %), its contribution to the overall clearance seems less important since muscle blood flow represents only 15 % of the cardiac output.¹⁸

As mivacurium undergoes elimination in the muscle tissue, we would expect the concentrations of its primary metabolites to be higher in venous than in arterial blood under steady state conditions. However, the concentrations of the *cis* and *trans* monoesters and of the *trans* alcohol were found to be similar in arterial and venous blood. This finding is not surprising when one considers the long elimination half-lives of the metabolites (100 min)² and given that steady state conditions were not reached for the metabolites even after a 2-h infusion of mivacurium. Also, the rate of formation of the metabolites is approximately 50 times faster than their *in vivo* rate of elimination, meaning that under constant infusion of mivacurium, extensive formation of metabolites overrides their elimination.

It is well recognized that arterial blood provides the most reliable pharmacokinetic parameters.^{13,15,16,20,21} The use of venous blood for studying mivacurium kinetics would lead to substantial overestimation of mivacurium clearance and volume of distribution. This was clearly demonstrated in our study since mivacurium arterial body clearance was as much as 34 % and 44 % lower than venous clearance for the *trans trans* and *cis trans* isomers, respectively. Such a difference was not observed with the *cis cis* isomer. It is worth emphasizing that the arterial clearances observed herein are quite similar to those reported by Lacroix et al² who used arterial blood but 50 % lower than those reported by other investigators when venous blood was used.^{1,5,6} Likewise, plasma clearance calculated using venous data is in close agreement with previous published data.^{1,5,6} Theoretically, for mivacurium and other ultra-short acting drugs eliminated in peripheral tissue, infusion regimens based on arterial rather than venous concentrations would be more appropriate especially in patients with a high arteriovenous gradient.

The sampling site not only affect pharmacokinetic parameters but also pharmacokinetic/pharmacodynamic estimates. This is particularly true for a drug such as mivacurium that is rapidly eliminated within the sampling tissue itself. Several investigators^{13,16,20,22,23} pointed out the implications of an arteriovenous gradient on the

concentration-effect relation. Parameters such as the EC_{50} , k_{e0} (the rate constant describing the lag time between concentration and effect) and γ (the slope factor) have been shown to differ for atracurium. A 40 % higher EC_{50} value and a 47% lower k_{e0} were observed for atracurium when arterial data were used instead of venous data.²² To our knowledge, the concentration-effect relation of the two active isomers of mivacurium has not been characterized in patients using a traditional model with a link to the central compartment although a model with a link to the peripheral compartment has been proposed.²⁴ Modeling difficulties are certainly attributable to the inherent complexity of this drug, although the presence of peripheral elimination may also contribute as the extraction of mivacurium across the forearm varies considerably between patients. This observation is in support of the large interindividual variability in the infusion rates required to obtain a stable neuromuscular blockade^{25,26} and in the time required to obtain spontaneous recovery from mivacurium neuromuscular blockade.²⁶⁻²⁹

Such a high interindividual variability in tissue metabolism is not surprising because mivacurium is hydrolyzed by plasma cholinesterase, an enzyme known to exhibit genetic polymorphism. Approximately 24 % of the white population carries at least one genetic variant allele of the plasma cholinesterase enzyme.³⁰ Patients with plasma cholinesterase deficiency exhibited slow hydrolysis of mivacurium and consequently, a prolonged neuromuscular block.^{26,28,31-34} Muscle tissue hydrolysis of mivacurium may complicate the situation since butyrylcholinesterase activity may differ between plasma and tissue. Such variability warrants monitoring of neuromuscular blockade in patients receiving mivacurium.

CONCLUSION

The major finding of our study is that significant extraction of the two active isomers of mivacurium occurs during their transit through the forearm, confirming the presence of an important elimination in peripheral tissue. This fact added to the known genetic polymorphism of plasma cholinesterase may account for the large intersubject variability in infusion rates and pharmacologic response of mivacurium. Therefore, arterial samples should be preferred to venous samples in studies designed to characterize the concentration-effect relation of such drugs, otherwise, conclusions may be wrong.

REFERENCES

1. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of mivacurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 1994; 80: 1296-1302
2. Lacroix M, Donati F, Varin F: Pharmacokinetics of mivacurium isomers and their metabolites in healthy volunteers after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 1997; 86: 322-330
3. Frampton JE, McTavish D: Mivacurium. A review of its pharmacology and therapeutic potential in general anaesthesia. *Drugs* 1993; 45: 1066-1089
4. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RP, Sunder N, Weakly JN, Wastila WB, el-Sayad HA: The clinical neuromuscular pharmacology of mivacurium chloride (BW B1090U). A short-acting nondepolarizing ester neuromuscular blocking drug. *Anesthesiology* 1988; 68: 723-732
5. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the three isomers of mivacurium in health, in end-stage renal failure and in patients with impaired renal function. *Br J Anaesth* 1995; 75: 31-36
6. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM: Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 1994; 73: 613-618
7. Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S, Harrelson JC, Welch RM, Samara B: Pharmacokinetics of mivacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. *Br J Anaesth* 1992; 69: 580-585

8. Jbilo O, Bartels CF, Chatonnet A, Toutant JP, Lockridge O: Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicol* 1994; 32: 1445-1457
9. Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O: Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem* 2000; 75: 1320-1331
10. Ummenhofer WC, Brown SM, Bernards CM: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are expressed in the spinal meninges of monkeys and pigs. *Anesthesiology* 1998; 88: 1259-1265
11. Bryant BJ, James CD, Cook DR, Harrelson JC: High Performance Liquid Chromatography Assay For Cisatracurium And its Metabolites in Human Urine. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 1997; 20 (13): 2041-2051
12. Lam G, Chiou WL: Determination of the steady state volume of distribution using arterial and venous plasma data from constant infusion studies with procainamide. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 132-134
13. Hermann DJ, Egan TD, Muir KT: Influence of arteriovenous sampling on remifentanil pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 511-518
14. Jacobs JR, Croughwell ND, Goodman DK, White WD, Reves JG: Effect of hypothermia and sampling site on blood esmolol concentrations. *J Clin Pharmacol* 1993; 33: 360-365
15. Armstrong PW, Moffat JA, Marks GS: Arterial-venous nitroglycerin gradient during intravenous infusion in man. *Circulation* 1982; 66: 1273-1276
16. Ericsson H, Bredberg U, Eriksson U, Jolin-Mellgard A, Nordlander M, Regardh CG: Pharmacokinetics and arteriovenous differences in clevidipine concentration

following a short- and a long-term intravenous infusion in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2000; 92: 993-1001

17. Williams LR, Leggett RW: Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas* 1989; 10: 187-217
18. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles R.P: Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* 1997; 13 (4): 407-484
19. Dwyer R, Howe J: Peripheral blood flow in the elderly during inhalational anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 939-944
20. Chiou WL: The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part II). *Clin Pharmacokinet* 1989; 17: 275-290
21. Viby-Mogensen J, Ostergaard D, Donati F, Fisher D, Hunter J, Kampmann JP, Kopman A, Proost JH, Rasmussen SN, Skovgaard LT, Varin F, Wright PM: Pharmacokinetic studies of neuromuscular blocking agents: good clinical research practice (GCRP). *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44: 1169-1190
22. Donati F, Varin F, Ducharme J, Gill SS, Theoret Y, Bevan DR: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium obtained with arterial and venous blood samples. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 515-522
23. Stanski DR, Hudson RJ, Homer TD, Saidman LJ, Meathe E: Pharmacodynamic modeling of thiopental anesthesia. *J Pharmacokinet Biopharm* 1984; 12: 223-240
24. Laurin J, Donati F, Nekka F, Varin F: Peripheral link model as an alternative for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of drugs having a very short elimination half-life. *J Pharmacokinet Biopharm* 2001; 28: 7-25

25. Brandom BW, Woelfel SK, Cook DR, Weber S, Powers DM, Weakly JN: Comparison of mivacurium and suxamethonium administered by bolus and infusion. *Br J Anaesth* 1989; 62: 488-493
26. Pellissier D, Bruder N, Mokart D, Quilichini D, Camatte S, Blache JL, Francois G: [Continuous administration of mivacurium for short procedures. Delayed onset and recovery from neuromuscular blockade]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995; 14: 467-471
27. Lien CA, Belmont MR, Abalos A, Hass D, Savarese JJ: The nature of spontaneous recovery from mivacurium-induced neuromuscular block. *Anesth Analg* 1999; 88: 648-653
28. Bevan DR, Donati F, Kopman AF: Reversal of neuromuscular blockade. *Anesthesiology* 1992; 77: 785-805
29. Kopman AF, Mallhi MU, Justo MD, Rodricks P, Neuman GG: Antagonism of mivacurium-induced neuromuscular blockade in humans. Edrophonium dose requirements at threshold train-of-four count of 4. *Anesthesiology* 1994; 81: 1394-1400
30. Lockridge O, Masson P: Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* 2000; 21: 113-126
31. Meistelman C: [Mivacurium and prolonged curarization]. Editorial. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995; 14: 463-464
32. Viggiano M, Soler C, Dumont JC, Pellissier D, Francois G: [Prolonged neuromuscular block after mivacurium injection]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995; 14: 502-504

33. Avargues P, Cros AM, Dardel E, Darriet M, Biteau N: [Value of the monitoring of curarisation during prolonged mivacurium induced neuromuscular block]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995; 14: 511-513
34. Ostergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J: Mivacurium-induced neuromuscular blockade in patients with atypical plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol Scand* JID - 0370270 1993; 37: 314-318

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Steady State Arterial Concentrations for *Cis Trans* (—), *Trans Trans* (- -) and *Cis Cis* Mivacurium (...) at Different Collection Times in Each Patient. Infusion Rates were 3 (Patient 1), 5 (Patients 2, 4, 7, 8) and 7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Patients 3, 5, 6).

Figure 2: Mean Arterial and Venous Steady State Concentrations for (A) *Trans Trans*, (B) *Cis Trans* and (C) *Cis Cis* Mivacurium in Eight Anesthetized Patients.

Table 1. Steady State Pharmacokinetic Parameters for Mivacurium Isomers

Patient	Infusion rate ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Normalized steady state plasma concentrations (ng/ml) ^a		Total body clearance ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		Arteriovenous extraction (%)
		Arterial	Venous	Arterial	Venous	
trans trans-mivacurium						
1	3	28 ± 1.5	14 ± 2.5	20	41	51
2	5	17 ± 0.0	8 ± 0.8	33	74	55
3	7	15 ± 1.9	11 ± 1.3	37	53	31
4	5	8 ± 0.3	7 ± 0.4	71	85	17
5	7	10 ± 0.5	7 ± 0.2	56	79	29
6	7	28 ± 1.6	18 ± 0.8	21	31	34
7	5	22 ± 4.0	15 ± 2.6	26	38	31
8	5	17 ± 0.2	13 ± 0.9	33	43	24
mean		18.4	11.6*	37	56*	34
SD		7.5	4.2	18	21	13
cis trans-mivacurium						
1	3	13 ± 0.7	7 ± 1.5	27	54	50
2	5	7 ± 0.0	3 ± 0.3	53	129	59
3	7	8 ± 0.5	4 ± 0.8	44	84	47
4	5	4 ± 0.3	2 ± 0.3	89	164	46
5	7	5 ± 0.3	4 ± 0.2	69	98	30
6	7	16 ± 1.4	10 ± 1.1	24	35	32
7	5	10 ± 2.0	6 ± 1.3	34	56	38
8	5	8 ± 0.1	5 ± 0.5	47	68	30
mean		8.9	5.2*	48	86*	42
SD		4.0	2.6	22	43	11
cis cis-mivacurium						
1	3	14 ± 0.2	13 ± 1.0	4	5	8
2	5	9 ± 0.9	9 ± 0.0	6	6	-1
3	7	6	6	10	10	0
4	5	9 ± 0.3	8 ± 0.5	7	7	4
5	7	8 ± 0.7	8 ± 1.1	7	7	-1
6	7	16 ± 1.0	15 ± 1.5	4	4	6
7	5	16 ± 2.1	15 ± 0.3	4	4	6
8	5	15 ± 0.2	15 ± 0.5	4	4	2
mean		11.7	11.2	6	6	3
SD		3.8	3.7	2	2	4

^a Each value represents the mean concentration obtained for the 3 periods ± SD after normalization to an infusion rate of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

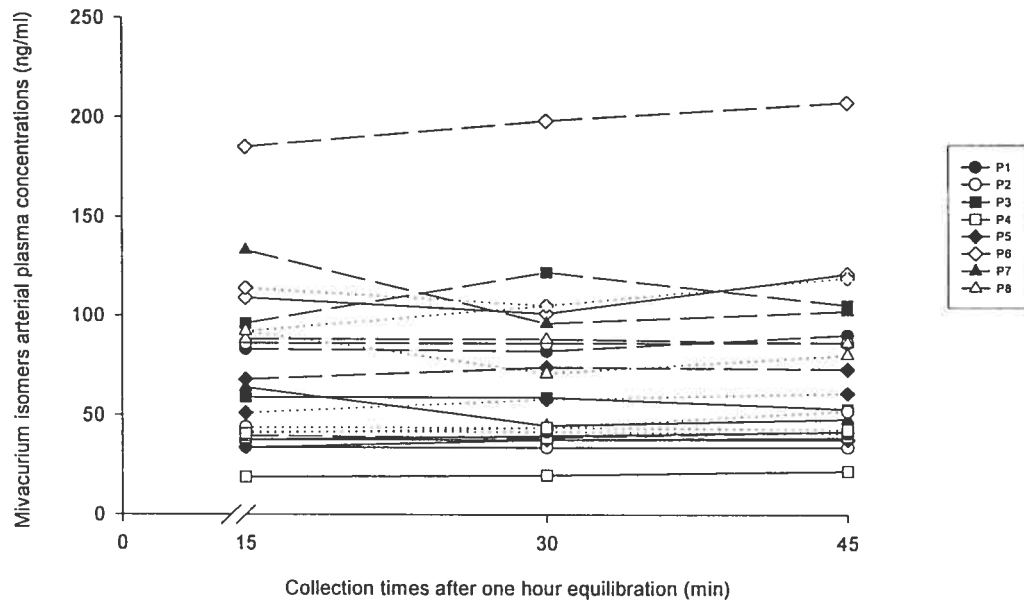
* P < 0.05

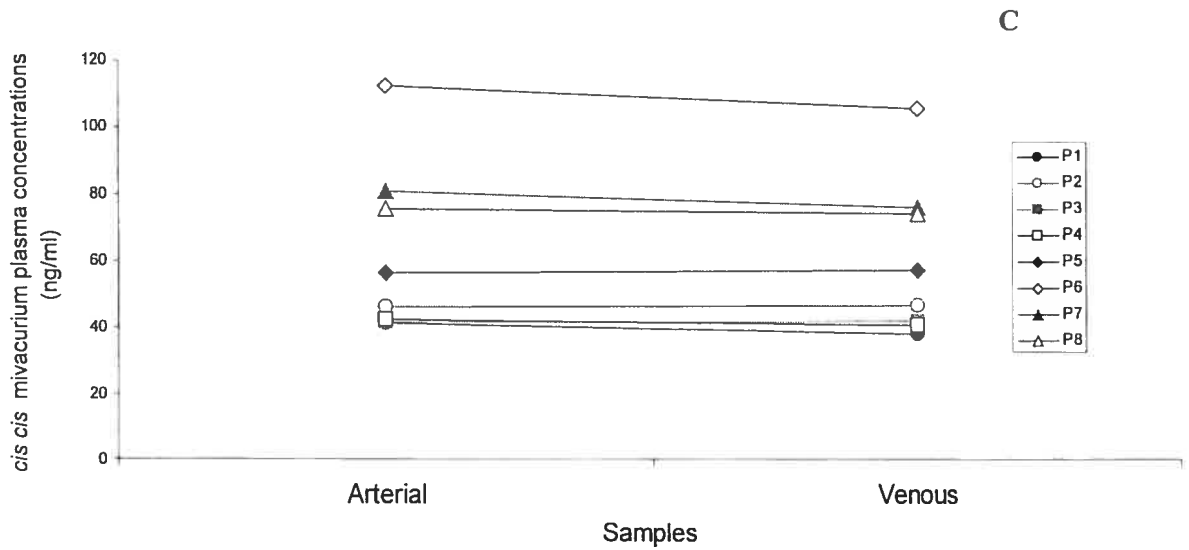
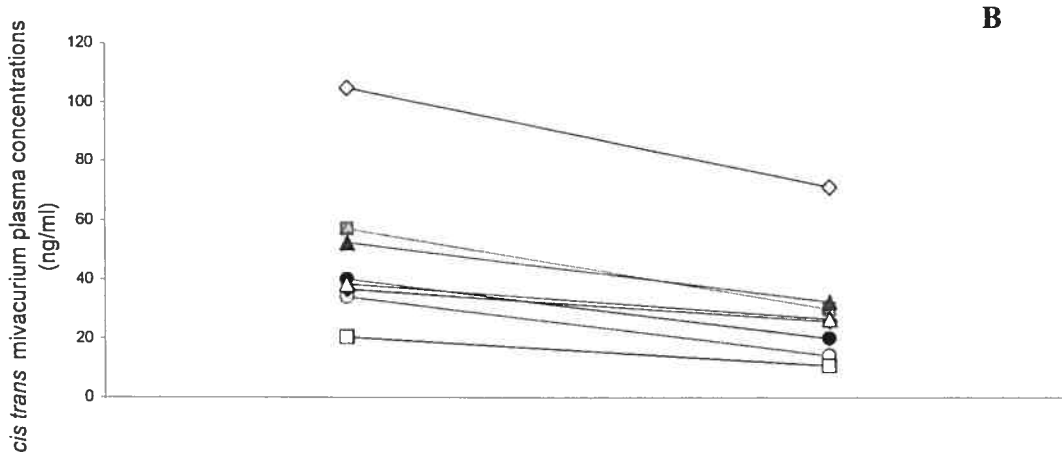
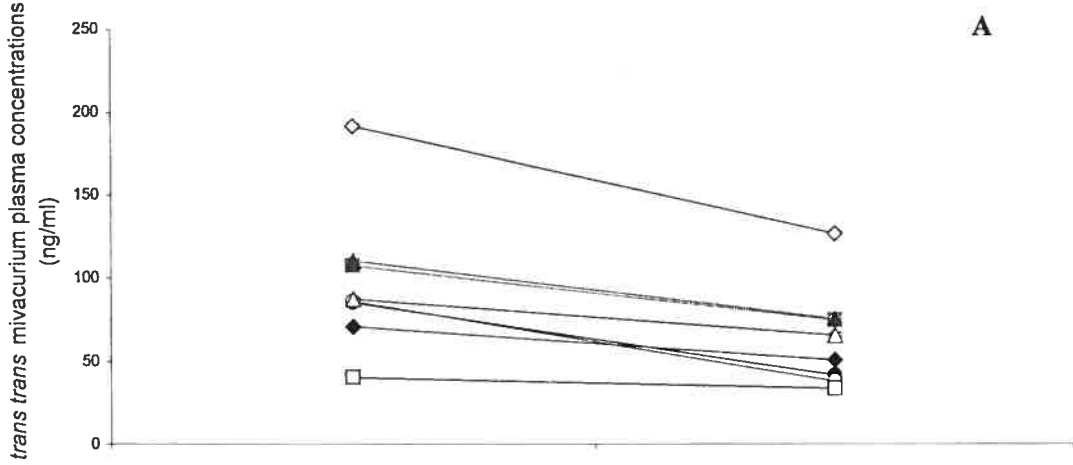
Table 2. Arteriovenous Plasma Concentrations for Mivacurium Metabolites

Patient	Infusion rate ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Plasma concentrations (ng/ml) ^a		Arteriovenous Extraction %
		Arterial	Venous	
cis monoester				
1	3	879 \pm 67	930 \pm 169	-6
2	5	527 \pm 101	531 \pm 100	-1
3 ^b	7	--	--	--
4	5	916 \pm 89	838 \pm 112	9
5	7	730 \pm 79	710 \pm 62	3
6	7	885 \pm 51	797 \pm 45	3
7	5	853 \pm 32	793 \pm 12	7
8	5	782 \pm 16	720 \pm 135	-2
mean		796	780	2
SD		135	129	5
trans monoester				
1	3	326 \pm 20	343 \pm 56	-5
2	5	204 \pm 32	207 \pm 36	-1
3 ^b	7	--	--	--
4	5	362 \pm 201	305 \pm 38	-8
5	7	288 \pm 84	246 \pm 17	2
6	7	269 \pm 13	269 \pm 13	0
7	5	30 \pm 3	277 \pm 2	10
8	5	224 \pm 38	255 \pm 12	-3
mean		270	272	-1
SD		41	43	6
cis alcohol				
1	3	8 \pm 1	9 \pm 0.2	-14
2	5	6 \pm 1	6 \pm 0.7	-5
3 ^b	7	--	--	--
4	5	15	15	4
5	7	7 \pm 0.2	7 \pm 0.5	-11
6	7	4 \pm 0.4	4 \pm 0.6	0
7	5	5 \pm 0.1	5 \pm 0.1	0
8	5	3 \pm 0.2	3 \pm 0.1	0
mean		7	7	-4
SD		4	4	7
trans alcohol				
1	3	193 \pm 16	204 \pm 31	-5
2	5	123 \pm 25	125 \pm 29	-2
3 ^b	7	--	--	--
4	5	129 \pm 20	115 \pm 17	11
5	7	92 \pm 6	89 \pm 3	3
6	7	97 \pm 6	95 \pm 10	2
7	5	117 \pm 5	117 \pm 4	0
8	5	116 \pm 2	116 \pm 3	1
mean		124	123	1
SD		33	38	5

^a Each value represents the mean concentration obtained for the three periods \pm SD after normalization to an infusion rate of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

^b Metabolites were not available





3.2 Determination of Interstitial Rocuronium Concentrations in the Muscle tissue of Anesthetized Dogs by Microdialysis

Samia Ezzine, D.Pharm, M.Sc⁴, Nobuharu Yamaguchi, Ph. D⁵, France Varin, B.Pharm,
Ph. D⁶

Correspondence should be addressed to:
Dr France Varin
Faculté de Pharmacie
Université de Montréal
2900 Edouard Montpetit
C.P 6128, succursale Centre-ville
Montréal (Québec)
H3C 3 J7
Canada

Tel : 514-343-7016, Fax : 514-343-5735
[REDACTED]

⁴ Ph.D student, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

⁵ Professor,

⁶ Professor, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

The work was performed at the Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

Presented in part at the Canadian Society of Pharmaceutical Sciences 4th Annual Symposium in Ottawa, Ontario, Canada. June 14-16, 2001.

Running Head: Quantitative microdialysis of rocuronium

ABSTRACT

Introduction: The objective was to establish and validate a microdialysis technique for the quantification of interstitial concentrations of the neuromuscular blocker, rocuronium, in the muscle tissue of dogs under steady state conditions.

Methods: The standard and combined retrodialysis approaches were used for *in vivo* microdialysis probe calibration. After induction of anesthesia with pentobarbital (30 mg/kg), the left femoral vein was cannulated and blood drawn for protein binding determination. Microdialysis probes were inserted in the muscle and calibrated *in vivo*, using vecuronium as the calibrator. Each dog received a short 2 min infusion followed by a 120 min infusion of rocuronium via the right jugular vein and three microdialysis samples were collected at steady state during a 2 h period. Samples were stored at -70°C until HPLC analysis.

Results: Using combined retrodialysis, rocuronium unbound interstitial (C_{ISFu}) and venous plasma (C_{pSSuV}) concentrations are in good agreement; with a ratio C_{ISFu} / C_{pSSu} of $100\% \pm 11\%$. Using standard retrodialysis, this ratio was $47\% \pm 7\%$.

Conclusion: Combined retrodialysis is a more reliable and accurate technique for quantitative assessment of rocuronium interstitial concentrations especially for lengthy anesthetic procedures. These findings have potential implications, as drug concentrations in the site of action would be more relevant for concentration-effect relation of muscle relaxants.

Key words: Dog, interstitial fluid, microdialysis method, muscle, rocuronium

INTRODUCTION

Unbound concentration is acknowledged as a major determinant of the pharmacokinetic profile and pharmacological response of a drug. Microdialysis, an *in vivo* sampling technique, provides a unique tool to evaluate extracellular drug concentrations in muscle tissue, offering significant advantages over tissue sampling techniques (Elmquist & Sawchuk, 1997; Hansen *et al*, 1999). Application of this technique in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies has been widely reviewed and several microdialysis calibration methods have been proposed (Elmquist & Sawchuk, 1997; Hansen *et al*; Johansen *et al*, 1997, Benveniste & Huttemeier, 1990, Ungerstedt, 1991). Microdialysis has been used to evaluate tissue interstitial concentrations of some antibiotics (Araki *et al*, 1997; DeGuchi *et al*, 1992, Kovar *et al*, 1997; Nolting *et al*, 1996, Eisenberg *et al*, 1993) and more recently, gallamine (Sasongko *et al*, 2002).

It is generally assumed that drug unbound concentrations are equal throughout the body under steady state conditions. By using muscle microdialysis, this basic assumption was verified for some drugs such as antibiotics and gallamine (Araki *et al*, 1997; DeGuchi *et al*, 1992; Sasongko *et al*, 2002). There have been no reports of tissue interstitial concentrations of rocuronium, a widely used neuromuscular blocking agent, almost exclusively distributed in the extracellular fluid. As rocuronium is eliminated unchanged by biliary and urinary routes in humans (Proost *et al*, 2000), it appeared a suitable model drug for this study.

The purpose of this study was to develop and validate a microdialysis technique in the muscle tissue of anesthetized dogs by comparing unbound plasma to tissue interstitial concentrations of rocuronium under steady state equilibrium. In doing so, the accuracy and reliability of *in vivo* calibration methods of the microdialysis probe were tested since this is a critical requirement for quantitative determination of drug concentrations in tissue interstitial fluid.

METHODS

Chemicals

Rocuronium bromide and vecuronium bromide were supplied by Organon Labs (West Orange, NJ, USA). All solvents were of HPLC grade and purchased from Anachemia. Stock solutions of rocuronium and vecuronium were made in 2M H₂SO₄ and kept at 4°C.

Microdialysis System

All microdialysis experiments were performed with commercially available flexible microdialysis probes of the concentric type (polyether sulfone tubular membrane: 10 mm length, 35 kDa molecular weight cutoff, 0.6 mm outer diameter) (S.P.E, Concord, Ontario). Modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer (124 mM NaCl, 3mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 1.3mM CaCl₂, 23mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose) was weekly prepared, filtered and degassed with a mixture of 5% CO₂ in O₂ to obtain a pH of 7.4 and used as the perfusate.

Drug Solutions

Vecuronium was used as a calibrator for rocuronium. The chemical structures of rocuronium and vecuronium are presented in Figure 1. Immediately before each experiment, solutions of 2000 ng/ml were prepared in buffer for vecuronium and rocuronium, respectively.

***In vitro* Microdialysis Experiments**

After proper conditioning, the microdialysis probes were immersed in a 2ml reservoir that was placed into a horizontal agitator (Eberbach) maintained at 37°C.

Effect of Perfusion Flow Rates

The probe was placed in the buffer solution containing rocuronium at 2000 ng/ml as a reservoir. The probes were connected to a precision infusion pump (Harvard, Holliston, Massachusetts) and perfused with buffer solution containing vecuronium at different flow rates (1, 2, 5 and 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Four replicates of microdialysate samples (40 minute collection periods) over 160 minutes of sampling were collected for each flow rate. The concentrations of rocuronium and vecuronium leaving the probe (dialysate concentrations: C_{out}), the concentrations of rocuronium in the reservoir (C_r) as well as the concentration of vecuronium entering the probe (perfusate concentrations: C_{in}) were determined by HPLC as described in the section on analytical determination.

Effect of Medium Concentration

At the optimal flow rate, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ the recovery of rocuronium and the loss of vecuronium were determined in quadruplicate at different concentrations, rocuronium being in the reservoir (100, 250, 500 and 1000 ng/ml) and vecuronium, 1000 ng/ml in the perfusate.

Effect of Diffusion Directions across the Probe Membrane

Both the recovery and loss of rocuronium and vecuronium were determined and compared at the optimal flow rate, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. The microdialysis probes were immersed in a reservoir containing rocuronium (2000 ng/ml) and perfused with buffer solution containing vecuronium (2000 ng/ml). The reservoir and perfusate solutions were subsequently inversed to contain vecuronium and rocuronium, respectively.

Recovery Calculations

For each sampling period ($n = 4$), relative recovery (RR%) and relative loss (RL%) were calculated for rocuronium and vecuronium as shown in equations 1 and 2. Recovery and loss were then averaged to obtain mean values for each calibration step. Rocuronium and vecuronium *in vitro* recoveries/losses were compared using a Wilcoxon Signed Rank test. The level of significance was set at 0.05.

$$\text{RR \%} = \frac{C_{\text{out}}}{C_r} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{RL \%} = \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times 100 \quad (2)$$

Analytical Determination of Rocuronium and Vecuronium Concentrations

Venous plasma samples were assayed for rocuronium concentration by a reversed phase HPLC method coupled with electrochemical detection. Plasma samples, were extracted on Bond Elut C1 solid phase extraction cartridges (Varian, Harbor city, CA, USA), and chromatographic separation was achieved using a CN spherisorb (5 μ m particle size) column, 15 cm x 4.6 mm I.D, maintained at 35°C with a column heater (CH-30, Eppendorf North America Inc., Madison, WI, USA). The mobile phase (pH= 4.75), containing bifiltered H₂O, acetonitrile and methanol (55: 35:10) was delivered at a flow rate of 1.8 ml/min by means of a ConstaMetric III pump (LDC Milton Roy, Riviera Beach, USA). Detection of rocuronium was accomplished using an electrochemical detector (Coulchem II, ESA Inc, USA) linked to a 5010 analytical cell (Environmental Sciences Assoc, Bedford, USA). The analytical cell potential was set at 750 mV. Chromatographic data were recorded and processed with an integrator (Shimadzu, Koyoto, Japan). We were unable to directly inject the microdialysis samples into the HPLC system because the salts interfered with the electrochemical detection. Microdialysis samples as well as standard curves containing rocuronium and vecuronium prepared in buffer, were diluted with blank plasma (1:4) and processed in the same manner as plasma samples. Under the conditions described, the lower limit of quantification of rocuronium and vecuronium was 5 ng/ml. Standard curves for rocuronium and vecuronium showed good linearity between 7.8 ng/ml and 5000 ng/ml ($r^2 = 0.99$) with coefficients of variation below 10 %. The inter-day precision gave a bias of less than 6%.

***In vitro* Protein Binding**

An ultrafiltration technique was performed in duplicate on spiked blank plasma using 30,000 μ membranes as previously described (Cameron *et al.*, 1995). The ultrafiltration devices containing 0.5 ml of the biological matrix were centrifuged at 1900 g for 5 minutes at room temperature. An aliquot (50 μ l) of the ultrafiltrate was acidified with sulfuric acid 2 M and frozen. Thawed ultrafiltrates were diluted with blank plasma and processed in the same manner as plasma samples for HPLC analysis. Rocuronium free fraction (fu) was calculated from the ultrafiltrate concentration / total concentration ratio.

Experimental Conditions

The *in vivo* experiment conducted in anesthetized dogs is schematized in Figure 2. After approval by the Animal Care Committee, eight adult male dogs (mongrel (5) or Beagle dogs (3)) with a body weight ranging from 7-20 kg were obtained from Biolab (Montreal, Quebec, Canada). The animals were singly housed and maintained under a 12 hour light-dark cycle at $70 \pm 5^{\circ}\text{F}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity. Food and water were freely available except before the 24h covering the day of the experiment. All animal experiments in this study were carried out according to the Canadian Council on Animal Care.

General Anaesthesia

On the day of the experiment, each dog was anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol[®]), 30 mg/kg iv. The level of anaesthesia was monitored based on hemodynamic parameters as well as the cornean reflex. A 4 mg/kg intermittent dose bolus was administered for maintenance of deep anaesthesia (approximately every 90 min). The animals were mechanically ventilated using a ventilator (Model 607, Harvard, South Natick, MA).

Animal Preparation

Once a satisfactory level of anaesthesia was achieved and physiological parameters were stable, the right jugular vein was cannulated for drug infusion and the left femoral vein was used for blood sampling. Blank plasma collected on sodium citrate 0.129 M was used for protein binding determination. Two small incisions (2 cm) were made in the animal's skin overlying the left gastrocnemius and gracilis muscles to allow insertion of two microdialysis probes. The microdialysis probe introducer was inserted into the muscle tissue using a needle guide, the guide was then removed and the probe inserted through the introducer. The latter was then removed leaving the microdialysis probe in the tissue. The probe was secured to the skin by a suture and covered with gauze pads. At least, a half-hour equilibration time was allowed for the tissue to recover while the probe was perfused with the buffer solution. Meanwhile, a three-way stopcock was installed on the arterial line for arterial blood pressure monitoring. Heart rate was monitored via the arterial pulse, and body temperature was maintained at 38°C during the experimental procedure.

***In vivo* Probe Calibration**

Two calibration methods were used in this study. Standard retrodialysis was used in the preliminary study (first three dogs). Using this method, no reference period was performed (Fig 2 A). After verification of the *in vivo* losses of both rocuronium and vecuronium in a few dogs, we decided to use combined retrodialysis for probe calibration in the second group (n = 5). With this method, a reference and a wash-out periods are introduced before rocuronium systemic administration (please refer to Fig 2 B).

Reference Period

Both microdialysis probes were perfused with a buffer solution containing vecuronium (2000 ng/ml) and rocuronium (2000 ng/ml) at a flow rate of 2 µl/min. After a 40

minute stabilisation period, three microdialysis samples were collected at 40 min intervals during 120 minutes. Each dialysate fraction was collected on 2 µl 2M sulfuric acid, kept on ice and stored at -70°C pending HPLC analysis. The relative losses of vecuronium and rocuronium were determined for each sampling period. The mean loss values were taken to calculate the efficiency ratio, k , as shown in equation 3. The *in vivo* relative losses of vecuronium and rocuronium were compared using a Wilcoxon Signed Rank test.

$$k = \left[\frac{RL_{\text{vecu}}}{RL_{\text{rocu}}} \right]_{\text{ref}} \quad (3)$$

Wash-out Period

Following the reference period, the perfusate was changed to contain only the calibrator, vecuronium, at a concentration of 2000 ng/ml. A wash-out period of 60 minutes was allowed before the start of the steady state period to ensure complete removal of rocuronium from the probes. This was verified by measuring rocuronium concentrations in the last sample collection of the washout period.

Steady State Period

This phase involves systemic administration of rocuronium to the animal. Each dog received a 2-min rocuronium infusion of 0.3 mg/kg followed by a 120 min infusion of 60 µg/kg/min via the right jugular vein. This infusion regimen was based on the results obtained in the first dog that received 0.3 mg/kg bolus followed by a 30 µg/min/kg infusion and our analytical sensitivity. Dog 7 received involuntarily a 0.69 mg/kg bolus followed by 129 µg/kg/min infusion. Therefore, interstitial fluid concentrations of dogs 1 and 7 were normalized to the dose administered in all other dogs.

Microdialysis Sampling

After a forty-minute period of infusion, steady state was assumed to be almost achieved in plasma (based on a 20 min half-life in preliminaries). Muscle interstitial fluid was sampled by microdialysis every 40 minutes for 120 minutes and processed as

described above. At the end of the microdialysis, aliquots of the perfusate (C_{in}) was also sampled for further determination of vecuronium concentrations. The relative loss of the calibrator ($RL_{vecu,exp}$) was calculated (equation 2) and assumed to be representative of the recovery of the drug at each sampling interval. Thus, the *in vivo* recovery of rocuronium ($RR_{rocu,exp}$) was determined using the loss of the calibrator corrected for the efficiency ratio, k , in the same dog, according to equation 4.

$$RR_{rocu,exp} = \frac{RL_{vecu,exp}}{k} \quad (4)$$

The actual concentration of rocuronium in the muscle interstitial space (C_{isfu}) was calculated as shown in equation 5.

$$C_{isfu} = \frac{C_{out}}{RR_{rocu,exp}} \quad (5)$$

Rocuronium concentration in the dialysate (C_{out}), assayed at each sampling interval during the experiment was corrected for rocuronium relative recovery ($RR_{rocu,exp}$) at the same sampling interval. As the difference between rocuronium interstitial concentrations was not statistically different using the Friedman Repeated Measures Analysis of Variance, these concentrations were pooled and averaged to obtain a mean rocuronium interstitial concentration for each dog. Data are expressed as mean \pm SD for the number of dialysate collections.

RESULTS

In vitro Microdialysis

Effect of Perfusion Flow Rate on Recovery / Loss

The recovery of rocuronium and the loss of its calibrator, vecuronium did not differ at the flow rates examined ($P = 0.5$) (Figure 3 A). At flow rates of 1, 2, 5 and 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, the recovery of rocuronium was $83\% \pm 4$, $53\% \pm 2$, $13\% \pm 2$ and $8\% \pm 3$, respectively. The loss of vecuronium was $80\% \pm 7$, $52\% \pm 1$, $16\% \pm 1$ and $8\% \pm 5$, respectively. As the flow rate increased, the percent recovery of rocuronium and the loss of vecuronium decreased from 80 to 8%. While a flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ provided the highest recovery, the optimal flow rate is a compromise between acceptable recovery, adequate sampling, resolution time and assay sensibility, that in turn, are influenced by sample volume. Consideration of this issue led to the selection of a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ with a 40 min sampling period for subsequent use in the *in vivo* studies.

Effect of Concentration on Recovery / Loss

The results illustrated in Figure 3 B show that, at the optimal flow rate, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, the percent recovery of rocuronium ($54\% \pm 1.5$) and the loss of vecuronium ($53\% \pm 0.5$) are comparable and concentration-independent.

Effect of Diffusion Direction Across Probe Membrane on Recovery / Loss

At a concentration of 2000 ng/ml and a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, the percent recovery of rocuronium and vecuronium was $51\% \pm 3$ and $52\% \pm 4$ ($n = 4$), respectively. The loss of rocuronium and vecuronium was $53\% \pm 1$ and $52\% \pm 2$, ($n = 4$) respectively. There was no directional dependence of diffusion of rocuronium and vecuronium across the microdialysis membrane.

***In vitro* Protein binding**

Mean rocuronium protein binding was $42 \% \pm 2$. When there was insufficient blank plasma to determine protein binding, the mean unbound fraction value was used to correct the total plasma concentrations.

***In vivo* Microdialysis**

Experimental results derived from muscle microdialysis are presented in Tables I and II. Although two probes per animal were installed, many of them failed from the beginning (dogs 1, 5 and 8) or after systemic drug administration (dogs 4, 6 and 8). Probe failure was often associated with the formation of air bubbles on the inside of the semi-permeable membrane. In some cases, it is not excluded that probe failure could have resulted from occlusion of membrane pores by cell debris. When both probes remained functional, a good agreement between recovery values was observed.

With standard retrodialysis, where no reference period was introduced, the *in vivo* and *in vitro* losses of vecuronium were similar, but a higher *in vivo* variability was observed (CV of 28% vs 5%, respectively). Using combined retrodialysis, an overall decrease in vecuronium *in vivo* loss was observed in both the reference and the steady state periods when compared to *in vitro* data.

When comparing the *in vivo* losses of rocuronium and vecuronium during the reference period, the mean loss of rocuronium was 25 % higher than that of vecuronium ($P = 0.006$) with mean efficiency factor, k of 0.8. The individual values of k varied considerably between dogs (0.3-1.16). When comparing the reference to the steady state period, the mean *in vivo* losses of vecuronium were increased by 19 %.

Using standard retrodialysis, the interstitial fluid concentration of the test drug (rocuronium) was deduced by dividing the concentration leaving the probe (C_{out}) by the relative loss of the calibrator (vecuronium) under steady state conditions. Even after correction, a substantial plasma to tissue gradient was found: rocuronium unbound interstitial fluid concentrations (451 ng/ml) represented only 47 % of

unbound venous plasma concentrations (Table I). An exploratory study was conducted in a separate set of dogs (n = 3, data not shown herein) to compare the *in vivo* losses of rocuronium and vecuronium using the same probes that were used in dogs 1 to 3. Although the ratio between the losses (the efficiency factor, k) was expected to be near 1 (according to *in vitro* results), it was found to be 2 ± 0.05 . After correction of rocuronium dialysate concentrations for the k value, the resulting interstitial fluid concentrations were 90 % of the unbound venous concentrations in dogs 1 to 3. Using combined retrodialysis, the dialysate concentrations corrected for the efficiency factor, k, yielded a mean interstitial concentration of 1377 ng/ml, representing 100% of rocuronium unbound venous plasma concentrations (Table II).

DISCUSSION

Direct measurement of rocuronium concentrations in the interstitial space of the muscle tissue has never before been reported. For that purpose, a microdialysis technique was developed in anesthetized dogs to quantitatively determine the concentration of rocuronium under steady state conditions. The major finding of the present study is that unbound rocuronium concentrations are similar in muscle interstitial fluid and venous plasma when using combined retrodialysis. Our results also indicate that, in lengthy experimental protocols, combined retrodialysis proves to be an accurate and reliable *in vivo* calibration technique that provides a close estimate of the venous concentrations of rocuronium.

When designing the experimental protocol, several *in vivo* methods have to be considered for the calibration of the microdialysis probes and that, in light of the claimed advantages and disadvantages of each technique (Hansen *et al*, 1999; Delange *et al*, 2000). Because of the relatively long elimination half-life of rocuronium (20-30 min), the zero net flux technique (Elmquist & Sawchuk, 1997; Hansen *et al*, 1999; Delange *et al*, 2000) could not be retained. Retrodialysis by drug, often considered as the ideal method for *in vivo* recovery determination, uses only the recovery of the drug itself during the reference period (Hansen *et al*, 1999). However, its underlying assumption, i.e that efficiency of the probe remains constant after systemic drug administration, is debatable since time-dependency has been documented for some drugs (Sarre *et al*, 1995, Olson & Justice, 1993). We therefore chose retrodialysis by calibrator because, with this method, probe efficiency is monitored during the experimental period.

In vitro calibration of the probes is a common prerequisite when setting up the experimental design for *in vivo* microdialysis. When similar diffusion characteristics are observed *in vitro* for the calibrator and the test compound, it is generally assumed that these characteristics will remain unchanged *in vivo*. For carbamazepine (Van Belle *et al*, 1993) and stavudine (Yang *et al*, 1997), this basic assumption was challenged and corroborated. When using standard retrodialysis, the concentration of the test drug (rocuronium) was deduced after correction of its concentration leaving the probe (C_{out})

for the loss of its calibrator (vecuronium) during the experimental period. In such a case, a substantial plasma to tissue gradient was found: under steady state conditions, rocuronium unbound interstitial fluid concentrations represented only 47 % of unbound venous plasma concentrations. No clear explanation for this discrepancy can be provided. It appeared unlikely that such a large gradient could result from uptake/elimination in the muscle tissue because rocuronium is eliminated unchanged via biliary and renal excretion in humans and animals (Proost *et al.*, 2000). Factors such as depth of anesthesia (Sancho *et al.*, 1997), local tissue reaction (Palsmeier & Lunte, 1994; Deleu *et al.*, 1995) and a different *in vivo* diffusion of the test drug or calibrator could be responsible for the discrepancy observed between tissue and plasma concentrations under steady state conditions.

The chemical structures of rocuronium and vecuronium are closely related and their *in vitro* diffusion characteristics have been found to be similar. However, it is not excluded that their *in vivo* diffusion may differ, as it was the case of some drugs (Sarre *et al.*, 1995; Sathle, 1991; Deleu *et al.*, 1995). In that respect, the loss of vecuronium may not represent the recovery of rocuronium under steady state conditions. This was believed to be the most plausible explanation for the large underestimation of the venous concentrations observed in the preliminary experiments. More specifically, it appeared necessary to characterize the *in vivo* diffusion characteristics of both the test drug and calibrator (as confirmed in separate experiments). This was also the rationale for using combined retrodialysis (Bouw & Hammarlund-Udenaes, 1998) as the calibration method for subsequent experiments.

During the reference period, a large interindividual variability was observed in the *in vivo* relative losses of rocuronium and vecuronium, an observation consistent with other reports (Sarre *et al.*, 1995, Deleu *et al.*, 1995). Based on *in vitro* results, the efficiency factor, k , was expected to be near 1, which proved to be the case in dogs 6-8. However, the efficiency factor was greatly decreased in dogs 4 and 5, indicating that the *in vivo* diffusion of both compounds was somewhat altered but not in a consistent manner. Although no clear explanation can be provided for the different *in vivo* behaviors of rocuronium and vecuronium, the chemical properties of these compounds (molecular weight, protein binding and partition coefficient) are quite similar (unpublished data) and these factors are not likely to play an important role. In our

opinion, differences between the *in vitro* and *in vivo* effective diffusion of a given compound are most probably caused by changes in permeability of the dialysis membrane occurring *in vivo* and are difficult to predict (Benveniste & Huttemeier, 1990; Delange *et al.*, 2000). Our results provide further evidence that the *in vivo* transfer of a substance across the microdialysis probe may differ between chemically very similar compounds. Under these circumstances, determination of the efficiency factor in each dog is an essential pre-requisite for quantitative and reliable estimation of the drug interstitial fluid concentration during the steady state period. The assumption underlying retrodialysis by calibrator, i.e. that *in vivo* effective diffusion of the calibrator and the test drug are equal, may not be realistic and requires validation in every specific application.

Retrodialysis by drug, often considered as the ideal method for *in vivo* recovery determination, is based on the recovery of the drug itself during the reference period (Hansen *et al.*, 1999). Its underlying assumption, i.e. that efficiency of the probe remains constant after systemic drug administration, is however debatable since time-dependency has been documented for some drugs (Sarre *et al.*, 1995, Olson & Justice, 1993). Indeed, time-dependent changes in the relative recovery from the microdialysis probe were observed for fluconazole (Yang *et al.*, 1997), acetaminophen (Sauernheimer *et al.*, 1994) and L-Dopa (Sarre *et al.*, 1995) but not for stavudine where recovery remained stable (Yang *et al.*, 1997). In the current study, the introduction of a reference period prior to the steady state period when using combined retrodialysis, disclosed inconsistent changes in the loss of the calibrator during the steady state period (Dogs 4-6). Hence, the cascade of factors that determine transcapillary exchange such as local blood flow, local capillary density and capillary permeability surface area product may change with time and thereby influence probe performance. These changes of a physiological and/or pharmacological origin were therefore considered as time-dependent. In our second group of dogs, an excellent agreement was found between interstitial fluid concentrations and unbound plasma concentrations for rocuronium under steady state conditions. Thus, in lengthy anesthetic procedures, continuous calibration is necessary to account for changes in probe efficiency.

In conclusion, combined microdialysis proves to be an accurate and reliable calibration technique for quantitative measurement of rocuronium concentration in the muscle tissue. These findings have potential implications as the concentration of the unbound drug at the site of action is an important determinant of the pharmacological response.

Acknowledgment: This research was supported by the Canadian Institutes of Health research (grant MA-10274). A CIHR-R&D studentship was awarded to Samia Ezzine.

The authors would like to thank Ms Johanne Couture and Ms Sanae Yamaguchi, Faculté de pharmacie, Université de Montréal for their technical assistance.

ABBREVIATIONS

C_{in} :	Concentration of the drug entering the probe
C_{out} :	Concentration of the drug leaving the probe
C_r :	Concentration of the drug in the reservoir
$C_{p_{ssv}}$:	Steady state venous concentration
$C_{ISF,u}$:	Interstitial fluid concentration
RR:	Relative recovery
RL:	Relative loss
$RL_{vecu,ref}$:	Vecuronium relative loss during the reference period
$RL_{rocu,ref}$:	Rocuronium relative loss during the reference period
$RR_{rocu,exp}$:	Rocuronium relative recovery during the steady state period

REFERENCES

- Araki, H., Ogake, N., Minami, S., Watanabe, Y., Narita, H., Tamai, I & Tsuji, A. (1997). Application of muscle microdialysis to evaluate the concentrations of the fluoroquinolones pazufloxacin and ofloxacin in the tissue interstitial fluids of rats, *J Pharm Pharmacol.*, 49, 1141-1144.
- Benveniste, H & Huttemeier, P.C. (1990). Microdialysis-theory and application. *Prog.Neurobiol.*, 35, 195-215.
- Bouw M.R. & Hammarlund-Udenaes, M. (1998). Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method, *Pharm Res.*, 15, 1673-1679.
- Cameron, M., Donati, F & Varin, F. (1995). In vitro plasma protein binding of neuromuscular blocking agents in different subpopulations of patients. *Anesth Analg.*, 81, 1019-1025.
- DeGuchi, Y., Terasaki, T., Yamada, H. & Tsuji, A. (1992). An application of microdialysis to drug tissue distribution study: in vivo evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of beta-lactam antibiotics in interstitial fluids. *J Pharmacobiodyn.*, 15,79-89.
- De Lange, E.C., De Boer, A.G. & Breimer, D.D. (2000). Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv.Rev.*, 45, 125-148.
- Deleu, D., Sarre, S., Ebinger, G & Michotte, Y. (1995) The effect of carbidopa and entacapone pretreatment on the L-dopa pharmacokinetics and metabolism in blood plasma and skeletal muscle in beagle dog: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther.*, 273,1323-1331.

- Eisenberg, E.J., Conzentino, P., Eickhoff, W.M. & Cundy, K.C. (1993) Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 29, 93-98.
- Elmqvist, W.F. & Sawchuk, R.J. (1997). Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res.*, 14, 267-288.
- Hansen, D.K., Davies, M.I, Lunte, S.M., & Lunte, C.E. (1999) Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci.*, 88, 14-27.
- Johansen, M.J., Newman, R.A., & Madden, T. (1997). The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy.*, 17, 464-481.
- Kovar, A., Dalla, C.T. & Derendorf, H. (1997). Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J Pharm Sci.*, 86, 52-56.
- Nolting, A., Costa, T.D., Vistelle, R., Rand, K.H. & Derendorf, H. (1996). Determination of free extracellular concentrations of piperacillin by microdialysis. *J Pharm Sci.*, 85, 369-372.
- Olson, R.J. & Justice, J.B.J. (1993). Quantitative microdialysis under transient conditions, *Anal Chem.*, 65, 1017-1022.
- Palsmeier, R.K. & Lunte, C.E. (1994). Microdialysis sampling in tumor and muscle: study of the disposition of 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-di-N-oxide (SR 4233). *Life Sci.*, 55, 815-825.
- Proost, J.H., Eriksson, L.I., Mirakhur, R.K., Roest, G & Wierda, J.M. (2000). Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans. *Br J Anaesth.*, 85, 717-723.

- Sancho, A.R., Dowell, J.A., Wolf, W. (1997). The effects of anaesthesia on the biodistribution of drugs in rats: A carboplatin study, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 40, 521-525.
- Sarre, S., Deleu, D., Van Belle, K., Ebinger, G. & Michotte, Y. (1995). Quantitative microdialysis for studying the in vivo L-DOPA kinetics in blood and skeletal muscle of the dog. *Pharm Res.*, 12, 746-750.
- Sasongko, L., Ramzan, I., Williams, K.M. & McLachlan, A.J. (2002). Muscle distribution of the neuromuscular blocker gallamine using microdialysis. *J Pharm Sci.*, 91.(3), 769.-775.
- Sauernheimer, C., Williams, K.M., Brune, K. & Geisslinger, G. (1994). Application of microdialysis to the pharmacokinetics of analgesics: problems with reduction of dialysis efficiency in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 32, 149-154.
- Stahle, L. (1991). Drug distribution studies with microdialysis: I. Tissue dependent difference in recovery between caffeine and theophylline. *Life Sci.*, 49, 1835-1842.
- Ungerstedt, U. (1991) Microdialysis Principles and applications for studies in animals and man. *J Intern.Med.*, 230, 365-373.
- Van Belle, K., Dzeka, T., Sarre, S., Ebinger, G & Michotte, Y. (1993). In vitro and in vivo microdialysis calibration for the measurement of carbamazepine and its metabolites in rat brain tissue using the internal reference technique. *J Neurosci Methods.*, 49, 167-173.
- Yang, H., Wang, Q. & Elmquist, W.F. (1997). The design and validation of a novel intravenous microdialysis probe: application to fluconazole pharmacokinetics in the freely-moving rat model. *Pharm Res.*, 14, 1455-1460.

Yang, Z., Brundage, R.C., Barbhaiya, R.H & Sawchuk, R.J. (1997). Microdialysis studies of the distribution of stavudine into the central nervous system in the freely-moving rat. *Pharm Res.*, 14, 865-872.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Chemical Structures of Rocuronium and Vecuronium

Figure 2: Schematic Representation of Experimental Protocols using (A) Standard Retrodialysis and (B) Combined Retrodialysis as The *In vivo* Experimental Protocol in Anesthetized Dogs

Figure 3: (A) Effect of Perfusion Flow Rates and (B) Rocuronium Concentrations on the *In vitro* Recovery of Rocuronium (•) and Loss of Vecuronium (◦) from The Microdialysis Probe. Data are Presented as Mean \pm SD, ($n = 4$)

Table I. Interstitial Rocuronium Concentrations versus Unbound Plasma Concentrations at Steady State using Standard Retrodialysis

Dog	Steady state period (n = 3) ^a				
	fu (%)	RL _{vecu,exp} (%)	C _{ISFu} (ng/ml)	Cp _{ssuv} (ng/ml)	C _{ISFu} /Cp _{ssuv} (%)
1	42 ^d	73 ± 1	690 ± 138 ^b	1355 ^b	51
2 ^c	39	38 ± 16	573 ± 30	1023 ± 25	56
3 ^c	42 ^d	49 ± 9	508 ± 44		49
		39 ± 6	256 ± 11	589 ± 111	43
		53 ± 9	228 ± 22		38
Mean ± SD		50 ± 14	451 ± 202	1052 ± 431	47 ± 7

a: number of dialysate fractions

b: Cp_{ssuv} and C_{ISFu} were normalized for the dose. Dog 1 received 0.3 mg/kg bolus followed by 30 µg/kg/min perfusion

c: results are presented for both probes

d: protein binding was not determined in these dogs and the mean value was used

Table II. Interstitial Rocuronium Concentrations versus Unbound Plasma Concentrations at Steady State Using Combined Retrodialysis

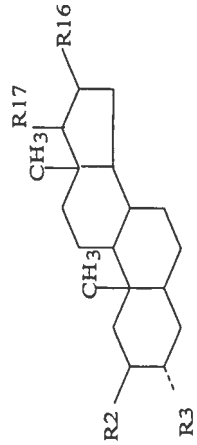
Dog	Reference period (n=3) ^a			Steady state period (n = 3) ^a					
	fu (%)	RL _{rocu, ref} (%)	RL _{vecu, ref} (%)	k	RL _{vecu, exp} (%)	RR _{rocu, exp} (%)	C _{ISFu} (ng/ml)	Cp _{ssuv} (ng/ml)	C _{ISFu} /Cp _{ssuv} (%)
4 ^c	44	37 ± 3	11 ± 3	0.30	16 ± 0	54	1245 ± 70	1060 ± 45	117
		47 ± 7	15 ± 1	0.33	N/A				
5	42 ^d	71 ± 9	47 ± 11	0.66	21 ± 7	32	1043 ± 51	1102 ± 37	94
		N/A			N/A				
6 ^c	41	25 ± 4	24 ± 2	0.95	44 ± 17	46	1652 ± 65	1912 ± 73	89
		25 ± 3	27 ± 3	1.09	N/A				
7 ^c	42 ^d	49 ± 7	57 ± 15	1.16	54 ± 28	47	1423 ± 57 ^b	1452 ± 33 ^b	98
		27 ± 2	24 ± 5	0.90	46 ± 4	51	1522 ± 118 ^b		104
8	43	31 ± 7	25 ± 9	0.80	—	—	—	1568 ± 134	—
		N/A							
Mean ± SD		39 ± 16	29 ± 16	0.8 ± 0.3	36 ± 17	46 ± 8	1377 ± 239	1419 ± 352	100 ± 11

a: number of dialysate fractions

b: Cp_{ssuv} and C_{ISFu} were normalized for the dose. Dog 7 received 0.69 mg/kg bolus followed by 129 µg/kg/min perfusion

c: results are presented for both probes

d: protein binding was not determined in these dogs and the mean value was used



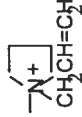
Neuromuscular Blocker

R2 R3 R16 R17

Rocuronium



HO⁻



CH₃COO⁻

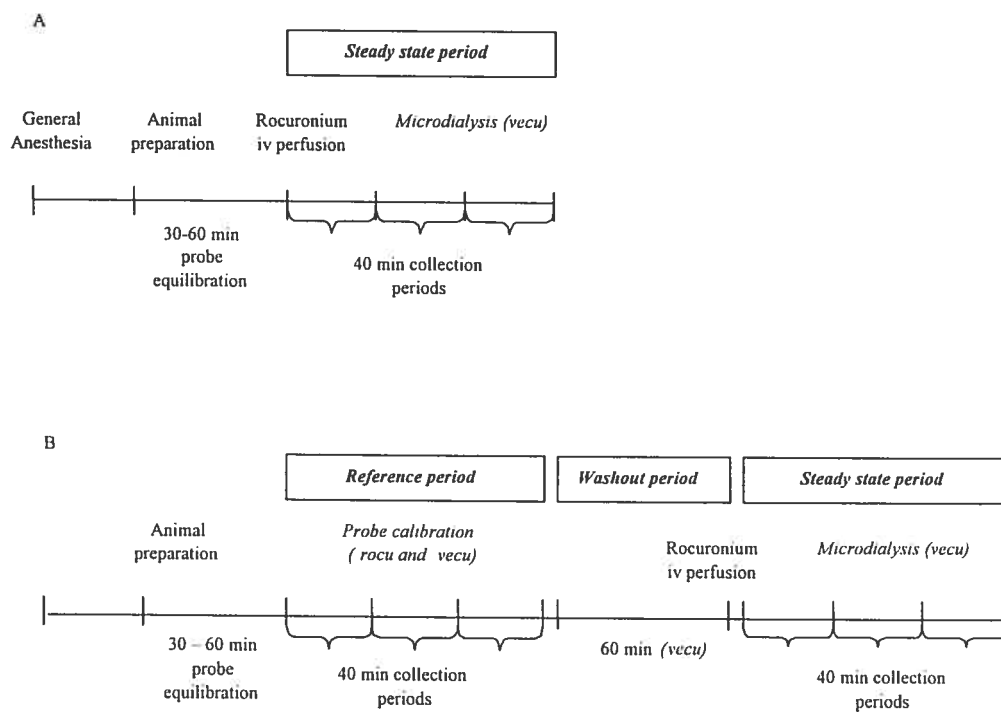
Vecuronium



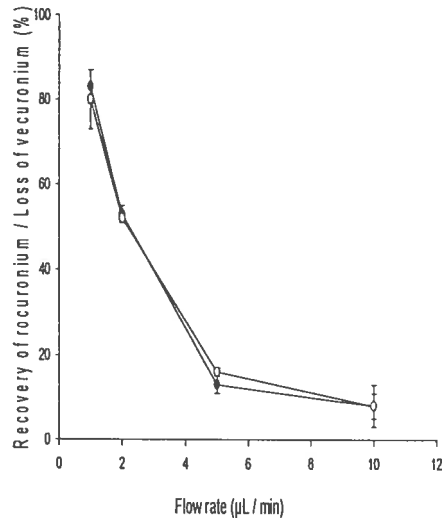
CH₃COO⁻



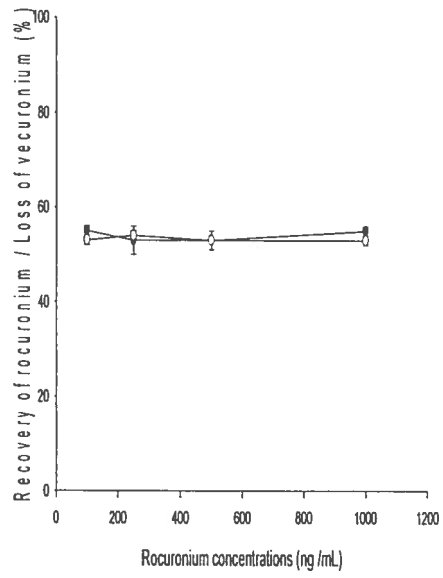
CH₃COO⁻



A



B



3.3 Interstitial Muscle Concentrations of rocuronium under Steady state Conditions in Anesthetized dogs: Actual versus Predicted Values

Samia Ezzine, D.Pharm, M.Sc⁷ and France Varin, B.Pharm, Ph.D⁸

Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence should be addressed to:

Dr France Varin
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
2900 Edouard Montpetit
C.P. 6128, succursale centre-ville
Montréal (Québec)
H3C 3J7
Canada

Tel: 514-343 7016, Fax : 343-5735

The work was performed at the Faculté de pharmacie, Université de Montréal

⁷ Ph.D student, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

⁸ Professor, Faculté de pharmacie, Université de Montréal

Funding: This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant MA-10274). A CIHR-R&D studentship was awarded to Samia Ezzine.

Acknowledgment: The authors would like to thank Ms. Johanne Couture and Ms. Sanae Yamaguchi, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, for their technical assistance.

Running Head: PK-PD of rocuronium in anesthetized dogs

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to compare rocuronium effect (C_e) and peripheral (C_2) compartment concentrations predicted by pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling to those measured in plasma (C_p) and in the interstitial fluid of the muscle tissue ($C_{ISF,u}$) by microdialysis in anesthetized dogs.

Methods: After approval by the Animal Care Committee, eight adult male dogs with a body weight ranging from 7-20 kg were anesthetized with pentobarbital. Each dog received a 2-min rocuronium infusion of 0.15 mg/kg/min followed by a 118 min infusion of 60 μ g/kg/min via the right jugular vein. Arterio-venous gradient across the hindlimb was measured at 40, 60, 100 and 120 min. Three microdialysis samples were collected at 40 min intervals. Once the infusion stopped, arterial samples were collected every 2 min for the first 10 min and every 20 min for the next 120 min. Neuromuscular function was monitored using train-of four stimulation until full recovery. Dogs were then sacrificed and a biopsy of muscle tissue performed (C_m).

Results: At steady state, the mean $C_{ISF,u}$ value was 1353 ng/ml. After correction for the unbound fraction in plasma, the mean $C_{e,corr}$ and $C_{2,corr}$ were 1681 ng/ml and 1481 ng/ml, respectively. At the terminal sampling point, C_m was 10 fold higher than C_p .

Conclusion: The unbound concentration of rocuronium measured in the muscle interstitial fluid under steady state conditions confirms that parametric PK-PD modeling gives reliable estimates of the effect site concentrations. Rocuronium accumulates in the muscle tissue, probably by non specific protein binding in the interstitial space.

INTRODUCTION

Inferences made from pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) studies are generally limited by the fact that drug plasma concentrations are measured instead of those within the tissue of pharmacodynamic interest. Thus, the time course of the predicted concentration in the effect compartment will depend heavily on the mathematical model while the true concentration at the effect site remains theoretical.¹

In the case of neuromuscular blocking agents (NMBAs), measurement of drug concentration in the muscle interstitial fluid would provide an invaluable insight into their concentration-effect relation. In that respect, microdialysis provides a unique tool for quantitative measurement of NMBAs at their site of action. Its application to the study of regional pharmacokinetics is more recent because quantitative determination of the drug concentration has been a limiting factor. Because rocuronium is almost exclusively eliminated unchanged by biliary and urinary routes in humans,² it was chosen as the model drug. This study was designed specifically to compare the effect and peripheral compartment concentrations of rocuronium predicted by PK-PD modeling to those measured in plasma and interstitial fluid of the muscle tissue in anesthetized dogs

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation

Animals

After approval by the Animal Care Committee, eight adult male dogs (mongrel (5) or Beagle dogs (3)) with a body weight ranging from 7-20 kg were obtained from Biolab (Montreal, Quebec, Canada). The animals were singly housed and maintained under a 12 hour light-dark cycle at $70 \pm 5^{\circ}\text{F}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity. Food and water were freely available except before the 24h covering the day of the experiment. All animal experiments in this study were carried out according to the Canadian Council on Animal Care.

General Anaesthesia

On the day of the experiment, each dog was anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol[®], Abbott Laboratories, Montreal, QC), 30 mg/kg iv. The animals were mechanically ventilated using a ventilator (Model 607, Harvard, south Natick, MA). Monitoring of the level of anaesthesia was based on hemodynamic parameters as well as the cornean reflex. A 4 mg/kg intermittent bolus dose was administered for maintenance of deep anaesthesia (approximately every 90 min). All invasive procedures were carried out before the administration of rocuronium. Thereafter, blood pressure and cardiac monitoring was used to monitor depth of anaesthesia.

Surgical Procedure and Hemodynamic Monitoring

Once a satisfactory level of anaesthesia was achieved and physiological parameters were stable, the right jugular vein was cannulated for drug infusion and the right carotid artery for blood sampling. Blank plasma collected on sodium citrate 0.129 M was used for protein binding determination. Two small incisions (2 cm) were made on the animal's skin overlying the left gastrocnemius and gracilis muscles to allow insertion of two microdialysis probes. At least one half-hour equilibration time was

allowed for the tissue to recover while the probe was perfused with the buffer solution. Meanwhile, a three-way stopcock was installed on the arterial line for arterial blood pressure monitoring. An electromagnetic flow probe (3 mm i.d, model FR-030T, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) was installed on the left femoral artery and connected to a polygraph system (model RM-6000, Nihon Kohden) for muscle blood flow measurement. In the femoral vein of the same leg, an indwelling catheter (Cathelon[®], Critikon, Tampa, Florida) was inserted to allow venous blood sampling. Heart rate was monitored via the arterial pulse, and body temperature was monitored by means of rectal probe maintained at 38°C during the experimental procedure.

Neuromuscular Monitoring

The medial cutaneous antebrachial nerve was stimulated supramaximally at the right forelimb through surface electrode with 0.2 msec, 40 to 70 mA impulses derived at a frequency of 2 Hz. This pattern was repeated every 12 seconds. The resulting force of contraction was measured using a force transducer (Grass F-10,). A stabilisation period of at least 5 min was allowed before injection of rocuronium. Muscle relaxation was monitored continuously until full recovery. The degree of neuromuscular block was expressed as the percentage of twitch height depression relative to the baseline values obtained immediately before the injection of rocuronium (onset) or after complete recovery (recovery). Using train-of-four stimulation, only the first twitch (T1) was considered, giving comparable results to those obtained with single twitch stimulation.³

Microdialysis Probe Calibration

The *in vivo* recovery of rocuronium from the microdialysis probe was then investigated in each dog using the combined retrodialysis described in details elsewhere.⁴ Briefly, rocuronium (2000 ng/ml) and its calibrator, vecuronium (2000 ng/ml) were delivered into the muscle before systemic administration of rocuronium (reference period). These low concentrations used for probe calibration did not produce any significant pharmacological effect as no change in twitch baseline was observed. Dialysate samples (n = 3) were collected each forty minutes and assayed for rocuronium and

vecuronium. The relative losses of the two compounds were determined afterwards by measuring their concentrations in the perfusate and dialysate. A ratio was established between the recoveries of the two compounds. After a wash-out period of 60 min was allowed to enable complete removal of rocuronium from the outflow cannula; this was confirmed later by HPLC analysis. During the steady state period, microdialysis probe calibration was continued by delivering vecuronium (in Krebs solution) into the muscle while perfusing rocuronium systemically. The relative loss of vecuronium from the probe into the muscle, corrected for the ratio previously determined (in the reference period) was used as an estimate of the *in vivo* recovery of rocuronium. This method has been validated previously ^{4,5} and has been shown to be accurate and reliable.

Drug Administration

Each dog received a 2-min rocuronium infusion of 0.15 mg/kg/min followed by a 118 min infusion of 60 µg/kg/min via the right jugular vein. This infusion regimen was based on the results obtained in 3 dogs during preliminaries. Dog 7 received inadvertently a 0.69 mg/kg bolus followed by 129 µg/kg/min infusion. Therefore, plasma and interstitial fluid concentrations of dog 7 were normalized to the dose administered in all other dogs.

Sample Collection

Following drug administration, arterial samples (3 mL) were collected at several time points until 100 % neuromuscular blockade, based on twitch tension. Arterial and venous blood samples (3ml) were collected simultaneously at 40, 60, 100 and 120 min after the beginning of rocuronium infusion. These three collection periods were used to confirm steady state equilibrium and tissue extraction (see data analysis). Muscle interstitial fluid (approximately 80 µl) was sampled continuously by microdialysis for 120 minutes (0-40, 40-80, 80-120 min) and processed as described below. The median time of each microdialysis period corresponded to blood sampling time for the arterio-venous gradient. At the end of the steady state period, arterial plasma (3 ml) was collected each 2 minutes for the first 10 minutes and each 20 minutes for the next

120 minutes. Plasma and dialysate samples were collected on 2M sulfuric acid, kept on ice and stored at -70°C pending HPLC analysis. For quality control purposes, aliquots of the perfusate and intra-venous solution were sampled at the end of the steady state period for future determination of vecuronium and rocuronium concentrations, respectively.

Muscle Biopsy

Euthanasia was then performed by iv injection of 130mg of pentobarbital followed by 20 ml of saturated KCl. Muscle tissue (3 g) was excised, carefully blotted dry and homogenized 5 min with ice cold 0.1 M monobasic ammonium phosphate buffer pH 3.0 in a ratio 1:6 (1 g tissue/6 ml buffer) (PowerGen * Homogenizer, Model 125, Fisher Scientific, Montréal, Canada). Samples were stored at -80°C until HPLC analysis.

Quantitative Analysis

HPLC Analysis.

Arterial and venous plasma samples as well as microdialysis samples were assayed for rocuronium concentration by a reversed phase HPLC method coupled with electrochemical detection.⁶ Chromatographic separation was achieved using a CN spherisorb (5 μm particle size) column, 15 cm x 4.6 mm I.D, maintained at 35°C with a column heater (CH-30, Eppendorf North America Inc., Madison, WI, USA). The mobile phase (pH= 4.75), containing bifiltered H_2O , acetonitrile and methanol (55: 35:10) was delivered at a flow rate of 1.8 ml/min by means of a ConstaMetric III pump (LDC Milton Roy, Riviera Beach, USA). Detection of rocuronium and vecuronium was accomplished using an electrochemical detector (Coulochem II, ESA Inc, USA) linked to a 5010 analytical cell (Environmental Sciences Assoc, Bedford, USA). The analytical cell potential was set at 750 mV. Chromatographic data were recorded and processed with an integrator (Shimadzu, Koyoto, Japan).

Plasma samples, assayed in duplicate, were extracted on Bond Elut C1 solid phase extraction cartridges (Varian, Harbor city, CA, USA). Microdialysis samples were

diluted with blank plasma and processed in the same manner as plasma samples. Direct injection into the HPLC was impossible due to the high ionic strength of the dialysate buffer. Under the conditions described, the lower limit of quantification of rocuronium and vecuronium was 5 ng/ml. Standard curves for rocuronium and vecuronium showed good linearity between 7.8 ng/ml and 5000 ng/ml ($r^2 = 0.99$). The coefficients of variation were below 10 %.

Muscle tissue homogenates were centrifuged 5 min at 1000 rpm before transfer on SPE cartridge to prevent clogging. Recovery tests for the centrifugation step were performed at three concentrations of rocuronium and indicated a loss of $\pm 1\%$ trapped in the residue. Calibration curves were prepared in blank muscle tissue ranging from 8 to 500 ng/ml ($r^2 = 0.9948$).

***In vitro* Protein Binding**

An ultrafiltration technique was performed in duplicate on spiked plasma using 30,000 μ membranes as previously described.⁷ The ultrafiltration devices containing 0.5ml of the biological matrix were centrifuged at 1900 g for 5 minutes at room temperature. An aliquot (50 μ l) of the ultrafiltrate was acidified with sulfuric acid 2 M and frozen. Thawed ultrafiltrates were diluted with blank plasma and processed in the same manner as plasma samples for HPLC analysis.

Arteriovenous Gradient

Each plasma sample drawn during the steady state period was assayed in duplicate. As the difference between duplicates proved to be less than 10%, the analytical error, the mean of the two values was used. After a forty-minute period of infusion, steady state was assumed to be mostly achieved in plasma (based on a 20 min half-life in preliminaries).

Data Analysis

Arteriovenous Gradient

The arterial concentrations measured at each collection time were compared using the Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. After statistical confirmation of steady state conditions, each dog's arterial concentrations were averaged and corrected for the unbound fraction. Venous samples were treated similarly. The arteriovenous gradient (E) of rocuronium was then calculated by applying the mean arterial ($C_{p_{ssa,u}}$) and venous ($C_{p_{ssv,u}}$) steady state plasma concentrations to the following formula:

$$E(\%) = \frac{C_{p_{ssa,u}} - C_{p_{ssv,u}}}{C_{p_{ssa,u}}} \times 100$$

Interstitial Fluid

Since microdialysate concentrations are time averaged over the collection interval, these values were translated into concentrations at a single point by assuming that the concentration obtained is the actual concentration at the middle point of the time interval.

Protein Binding

Rocuronium unbound fraction in plasma ($f_{u,p}$) was calculated by dividing the ultrafiltrate concentration ($C_{p,u}$) by the total concentration (C_p). The *in vitro* ratio ($f_{u,p}$) was then multiplied by the steady state plasma concentration measured *in vivo* to obtain $C_{pss,u}$ and as a correction factor for C_2 and C_e .

Pharmacokinetic Analysis

Central Compartment Concentration

A two-compartment mamillary model with a zero order input rate and elimination from the central compartment was fitted to the plasma concentration-time profile of rocuronium. A two-compartment model was selected after standard verification of its adequacy using Akaike criteria (AIC). WinNonlin 1.5 software (Pharsight, Mountain View, CA) was used for pharmacokinetic analysis. Point estimates and pharmacokinetic parameters were optimized for each dog using a standard minimization method (Gauss-Newton, Levenberg and Hartley).^{8,9} A weighting function of $1/(\text{predicted } y)^2$ was applied. The following parameters were derived for each dog using standard formulae : A, B, the coefficients, α , β , the fast distribution and elimination rate constants, V_1 , V_2 , V_{ss} , the central, peripheral and total apparent volume of distribution at steady state and CL, the total body clearance; the transfer rate constants between the peripheral and central compartment, k_{12} and k_{21} .

Peripheral Compartment Concentration

For each dog, the peripheral compartment concentration (C_2) vs time curve was simulated by substituting the derived pharmacokinetic parameters into the following equation:¹⁰

$$C_2 = \frac{k_{12}k_0}{V_2} \left[\frac{(1 - e^{\alpha T})}{-\alpha(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{(1 - e^{\beta T})}{-\beta(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \right]$$

where k_0 is the zero-order infusion rate and T the duration of the infusion.

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis

Effect Compartment Concentration

Using the pharmacokinetic parameters previously derived for rocuronium, a parametric link model¹¹ coupled to a sigmoid E_{\max} model were used to derive the equilibrium rate constant between the central and the effect compartment (k_{e0}), the effect compartment concentration at 50 % block (EC_{50}) and the slope of the sigmoid curve (γ). The WinNonlin software was used for all PK-PD analyses. A weighting function of 1 was applied and the goodness of fit was assessed by the Akaike information criterion. For each dog, the effect compartment concentration was calculated for a two-compartment model and a zero-order input using the PK-PD estimates as described by Holford and Sheiner.¹²

$$C_e = \frac{k_0 k_{e0}}{V_1} \left[\frac{(k_{21} - \alpha)(e^{\alpha T} - 1)e^{-\alpha t}}{\alpha(\beta - \alpha)(k_{e0} - \alpha)} + \frac{(k_{21} - \beta)(e^{\beta T} - 1)e^{-\beta t}}{\beta(\alpha - \beta)(k_{e0} - \beta)} + \frac{(k_{21} - k_{e0})(e^{k_{e0} T} - 1)e^{-k_{e0} t}}{k_{e0}(\alpha - k_{e0})(\beta - k_{e0})} \right]$$

RESULTS

Our eight dogs had a mean weight of 14 kg (range 7.4-17.5). During the calibration period, the total dose of muscle relaxants (rocuronium and vecuronium) administered locally for probe calibration was kept minimal. No systemic concentrations or twitch depression were detectable. Individual data for femoral blood flow, arterial blood pressure, unbound fraction in plasma, haematocrit and arteriovenous gradient during steady state are presented in Table I.

Individual pharmacokinetic estimates are presented in Table II as mean \pm SD. The mean distribution half-life $t_{1/2\alpha}$ was 3.7 ± 1.8 min and the mean elimination half-life $t_{1/2\beta}$ was 34 ± 5 min. Individual pharmacodynamic parameters are presented in Table III. The onset time were variable among dogs and ranged between 0.6 to 6.6 min. The mean 25%-75% recovery index ranged from 0.9 to 17.7 min. The *in vivo* time-concentration profiles of rocuronium for each dog, as well as the percentage of neuromuscular block as a function of time are presented in Figure 1.

Figure 2A shows a typical plasma concentration-time profile (dog # 5) having a median fit. The observed and predicted effects at different times for the same dog are shown in figure 2B. Individual PK-PD parameters are presented in Table IV. The mean EC_{50} was 353 ng/ml and the mean $t_{1/2ke0}$ was 5.54 min.

The individual effect and peripheral compartment concentrations derived from PK-PD parameter estimates are presented in Table V. Before correction for the unbound concentration in plasma, the mean C_e and C_2 values were 4029 ng/ml and 3615 ng/ml, respectively.

The unbound concentrations of rocuronium in the muscle interstitial fluid as determined by microdialysis are presented in Table V. The mean $C_{ISF,u}$ value was 1353 ng/ml. Interstitial fluid concentrations are not given for the first three dogs because these concentrations were underestimated due to an inappropriate method of microdialysis probe calibration. This issue was addressed in details elsewhere.⁴

Interstitial fluid concentrations are not available for dog #8 due to a failure of the microdialysis probe during the experimental period.

Muscle tissue concentrations at the terminal sampling point are presented in Table VI. The mean concentration in whole muscle homogenate (C_m) was 541 ng/ml with a corresponding plasma concentration of 38 ng/ml.

DISCUSSION

The major finding of this study is that, under steady state conditions, the unbound concentrations of rocuronium measured in the muscle interstitial fluid are equivalent to those predicted for the effect and peripheral compartments by PK-PD modeling on the basis of unbound plasma concentrations. This is important as the effect compartment concentrations remain hypothetical in absence of *in vivo* confirmation of the actual concentrations at the site of action. At the beginning of the infusion, the unbound concentrations in the muscle interstitial fluid and plasma correlated well. At the terminal sampling point, rocuronium concentrations in the whole muscle homogenate were several fold higher than those in plasma.

The pharmacokinetics of rocuronium has been well characterized in patients¹³ but reports for studies carried out in animals are limited. To our knowledge, there is no previous study reporting the PK-PD parameters of rocuronium in animals. Our bolus dose was based on a reported ED90 of 0.18 mg/kg for rocuronium in beagle dogs anesthetized with pentobarbital.¹⁴ Rocuronium onset of action was slightly more rapid compared to that in our study (2.1 min vs 3.3 min), probably as a result of the input rate (bolus vs short infusion). The infusion regimen for the steady state period was based on the analytical sensitivity required for microdialysis. The mean equilibration rate between rocuronium plasma and effect compartment concentrations (k_{e0}) in our dogs is comparable to that found in humans.^{13,15,16} However, a lower EC₅₀ is observed in dogs. It is unclear whether this increased sensitivity is species dependent or related to pentobarbital anesthesia.

Microdialysis in the muscle tissue has been used to describe the regional kinetics of drugs having mostly an extracellular distribution (piperacillin¹⁷, ceftriaxone¹⁸ and gallamine¹⁹). As a bolus dose was given in anesthetized rats, it was not possible to verify if, at distribution equilibrium, the unbound concentration in plasma and muscle interstitial fluid were equal. The physiological models used for simulations assumed that drug transfer between plasma and tissue is driven by diffusion only. When the concentrations predicted for the tissue compartment and those measured in the muscle interstitial fluid were compared, an excellent agreement was found.

To our knowledge, there is only one study²⁰ where microdialysis in the muscle tissue was performed under steady state conditions. For cefaclor, the unbound arterial plasma concentrations were found to be fourfold higher than those measured in the muscle interstitial fluid. A clear explanation for the gradient could not be provided because of the well known chemical instability of this drug. This also implies that unrestricted diffusion of the free fraction across capillaries cannot be taken for granted for all drugs.

Rocuronium was therefore chosen as the model drug for neuromuscular blocking drugs because of its chemical stability and absence of significant biotransformation². In a separate report, we have detailed how quantitative determination of rocuronium interstitial concentrations in the muscle tissue of dogs by microdialysis was validated.⁴

For the collection period corresponding to the first 40 min of infusion of rocuronium, muscle interstitial fluid concentrations were very close to the unbound arterial concentrations (Figure 2). This good agreement suggests a rapid transcapillary transfer of the unbound concentration of rocuronium into the extracellular fluid. Similar findings were observed for antibiotics^{17,18,20} and for gallamine following an iv bolus dose.¹⁹ In the latter study, muscle interstitial fluid samples were collected during 15 min intervals for 8 hours (equivalent to one elimination half-life). The muscle interstitial fluid and arterial plasma concentration time profile declined in parallel during both the distribution and elimination phases. These results suggest that, for hydrophilic drugs, the unbound concentrations in muscle interstitial fluid and arterial plasma belong to the same kinetic pool.

After two hours of infusion, rocuronium interstitial concentrations proved to be equal to the unbound venous concentrations but slightly lower than the arterial ones in all but one dog (dog # 3 had no arterio-venous gradient). A mean arteriovenous gradient of 6 % is usually considered as negligible as it falls within the error of the analytical method. However, this gradient subsided after an infusion period equivalent to four plasma elimination half-lives, suggesting that the equilibrium within the muscle tissue is not completely achieved (94% of steady state according to our calculations). This observation is compatible with a slow transfer into muscle cells as one would expect for a drug having a very low partition coefficient.²¹

When the peripheral and effect compartment concentrations are mathematically derived from plasma concentrations, one assumes that the tissue/plasma concentration ratio of the unbound fraction of drug is equal to 1 under steady state conditions. Since the protein bound fraction is not pharmacologically active, there is no practical implication for the PK-PD relation. This assumption was corroborated by microdialysis in our study by measuring the unbound concentration of rocuronium in the muscle interstitial fluid, which represents the biophase for neuromuscular blocking drugs. Under steady state conditions, we found an excellent agreement between the effect site concentration derived mathematically and the muscle interstitial concentration measured by microdialysis. This provides further evidence that a parametric PK-PD model can yield reliable estimates of the effect site concentrations at doses where complete neuromuscular blockade is maintained for a long period.

Insights on the intratissular distribution of rocuronium was obtained shortly after sacrifice. The concentrations measured in the whole muscle tissue, although quite variable, were more than 7 times higher than their corresponding concentration in plasma, the latter being almost negligible. If one takes into account that muscle tissue represents 45 % of total body weight in dogs, the amount of rocuronium in the muscle tissue would correspond to 95% of the total amount of rocuronium present in the body at the terminal sampling time. Rocuronium concentrations in whole muscle homogenate were also more than twofold those predicted for the peripheral compartment on the basis of the unbound concentration in plasma. In pharmacokinetic modeling, compartments refer only to the amount of drug in a distinct kinetic pool and

do not correspond to anatomical identifiable compartments. This notwithstanding, these results indicate a preferential accumulation of rocuronium in the muscle tissue.

The cellular permeability of rocuronium is very low. After a 2 hour infusion, the total concentration of rocuronium in the cerebrospinal fluid of anesthetized patients was found to represent only 2-3 % of the unbound concentration in plasma.²² Thus, the distribution of rocuronium is mostly confined to the extracellular fluid. In our dogs, rocuronium plasma concentrations were negligible at the time of sacrifice. It follows that the amount of rocuronium measured in the muscle tissue homogenate would originate from the interstitial space. As the volume of the latter occupies 33 % of the water content of the muscle in dogs, the concentration of rocuronium in the interstitial fluid would be threefold higher than that measured in the whole muscle.

In contrast, the muscle tissue/plasma concentration ratio of gallamine was only 0.2 after a bolus dose in anesthetized rats.¹⁹ Since gallamine does not bind to proteins, this finding supports the hypothesis that protein binding in the interstitial space may be responsible for the accumulation of rocuronium in the muscle. Unfortunately, our attempts to collect directly the muscle interstitial fluid with a push-pull canula were unsuccessful. It was thus impossible to estimate the free fraction within the interstitial space. However, considering that the neuromuscular function completely recovered at that time, most of rocuronium molecules in the muscle tissue would not be bound to the acetylcholine receptors. This suggests that the high muscle/plasma concentration ratio of rocuronium at the time of sacrifice would result from nonspecific protein binding in the interstitial space.

CONCLUSION

The major finding of this study is that the quantitative measurement of the unbound fraction of rocuronium in the muscle tissue provides evidence that a parametric PK-PD model can yield reliable estimates of the effect site concentrations. This is also the first study reporting a significant accumulation of rocuronium in the muscle tissue, probably by non specific protein binding in the interstitial space.

Table I. Physiological Parameters, Protein Binding and Arteriovenous Gradient in Dogs under Continuous Infusion of Rocuronium

Dogs	Weight (kg)	Blood flow ^b (ml/ min/ kg)	Arterial Pressure (mm Hg)	Haematocrit (%)	Unbound fraction (%)	A-V gradient (%)
1	14.7	12 ± 1	160/120	N/A	42 ^a	N/A
2	15.1	5 ± 2	140/100	42 ± 1	39	9
3	17.1	3 ± 0	160/120	43 ± 0	42 ^a	0
4	17.5	3 ± 1	160/120	39 ± 1	44	6
5	12.6	2 ± 0	140/110	53 ± 2	42 ^a	8
6	12.0	3 ± 0	120/95	43 ± 2	41	5
7	7.4	3 ± 2	120/100	43 ± 4	42 ^a	8
8	12.8	2 ± 0	130/90	48 ± 1	43	9
Mean	14	4	141/107	44	42	6
SD	3	3	17.3/12.2	5	2	3

^a Protein binding was not determined in these dogs and the mean value was used

^b Measured at the femoral artery

Table II. Rocuronium Pharmacokinetic Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	Curve parameters			Microconstants			PK parameters				
	A (ng/ml)	B (ng/ml)	α (min^{-1})	β (min^{-1})	k_{10} (min^{-1})	k_{12} (min^{-1})	k_{21} (min^{-1})	V_1 (L/kg)	V_{ss} (L/kg)	V_β (L/kg)	CL (ml/min/kg)
1	5813	71	0.369	0.027	0.320	0.045	0.031	0.044	0.109	0.531	14.2
2	3002	91	0.240	0.019	0.192	0.055	0.026	0.084	0.256	0.874	16.6
3	1077	31	0.139	0.020	0.119	0.016	0.023	0.235	0.406	1.440	28.8
4	3404	61	0.329	0.022	0.267	0.057	0.028	0.075	0.229	0.914	20.1
5	4165	69	0.343	0.018	0.268	0.071	0.023	0.062	0.250	0.917	16.5
6	6091	92	0.192	0.020	0.171	0.019	0.022	0.042	0.077	0.360	7.2
7	2020	119	0.134	0.019	0.101	0.027	0.026	0.122	0.249	0.653	12.4
8	1848	62	0.113	0.024	0.101	0.009	0.027	0.137	0.185	0.582	13.9
Mean	3427	74.5	0.232	0.021	0.192	0.037	0.026	0.100	0.220	0.784	16.2
SD	1833	26.3	0.103	0.003	0.085	0.023	0.003	0.064	0.101	0.333	6.3

A, α , coefficient and initial distribution rate constant; B, β , coefficient and terminal elimination rate constant; k_{10} , elimination rate constant from compartment 1; k_{12} , transfer rate

constant from the first to the second compartment; k_{21} , transfer rate constant from the second to the first compartment; V_1 , apparent volume of distribution in the central compartment

V_{ss} , apparent volume of distribution at steady state; V_β , apparent volume of distribution during the terminal elimination phase, CL, total body clearance

Table III. Rocuronium Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	Onset time (min)	T _{25%} (min)	T _{50%} (min)	T _{75%} (min)	I ₂₅₋₇₅ (min)
2	0.6	2.5	4.7	10.4	7.9
3	6.6	2.6	4.7	7.5	4.9
4	3.4	2.3	5.3	8.9	6.6
5	2.6	10.4	14.1	18.5	8.1
6	1.6	3.5	7.4	14.3	10.8
7	1.6	0.8	1.3	1.9	0.9
8	3.7	3.2	13.2	20.9	17.7
Mean	2.9	3.6	7.2	11.8	8.1
SD	1.8	3.4	5.0	7.2	5.7

Onset, time at 90% neuromuscular block; T_{25%}, T_{50%}, T_{75%}, time to 25%, 50% and 75% recovery, respectively, I₂₅₋₇₅, recovery index

Table IV. Rocuronium Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Parameters in Pentobarbital Anesthetized Dogs

Dog	EC ₅₀	Gamma	k _{e0}
2	558	10.0	0.043
3	464	4.4	0.205
4	441	10.0	0.087
5	255	9.4	0.079
6	160	7.5	0.111
7	248	10.0	0.178
8	549	3.7	0.092
Mean	353	7.5	0.125
SD	153	2.8	0.053

K_{e0}, effect compartment equilibration rate constant; EC₅₀, effect compartment concentration at 50 % block; gamma, slope factor.

Table V. Steady state Rocuronium Concentrations in Pentobarbital Anesthetized Dogs

Dog	Observed			Predicted	
	f_u (%)	$C_{p_{ssa,u}}^a$ (ng/ml)	$C_{isf,u}^a$ (ng/ml)	$C_{e,corr}$ (ng/ml)	$C_{2,corr}$ (ng/ml)
4	44	1130 ± 48	1245 ± 70	1156	1038
5	42	1198 ± 40	1043 ± 51	992	1081
6	41	2013 ± 77	1652 ± 65	2876	2462
7 ^b	42	1578 ± 36	1473 ± 88 ^c	1700	1341
8	43	1724 ± 147	N/D	1603	1433
Mean	42	1529	1353	1681	1481
SD	1	369	229	852	668

$C_{e,corr}$ and $C_{2,corr}$: effect and peripheral compartment concentrations corrected on the basis of the unbound fraction in plasma, f_u ;

$C_{isf,u}$: muscle interstitial concentration; $C_{p_{ssa,u}}$: unbound arterial plasma concentration at steady state after correction of the free fraction in plasma

^a Mean ± S.D. of three collection periods

^b Dose normalized

^c $C_{isf,u}$ is the mean value of the results obtained from two microdialysis probes

Table VI. Rocuronium Concentrations at Terminal Sampling Point in Pentobarbital Anesthetized Dogs

Dog	Observed			Predicted	
	t (min)	C _p (ng/ml)	C _m (ng/g)	C _e (ng/ml)	C ₂ (ng/ml)
4	134	21	450	41	142
5	126	51	380	87	307
6	130	73	780	60	546
7*	160	21	773	41	147
8	133	22	320	29	188
Mean		38	541	52	266
SD		24	220	23	170

C_e, effect compartment concentration; C₂, peripheral compartment concentration; C_p, plasma concentration;

C_m, concentration in whole muscle homogenate; t, time elapsed after the end of the perfusion


*Dose normalized

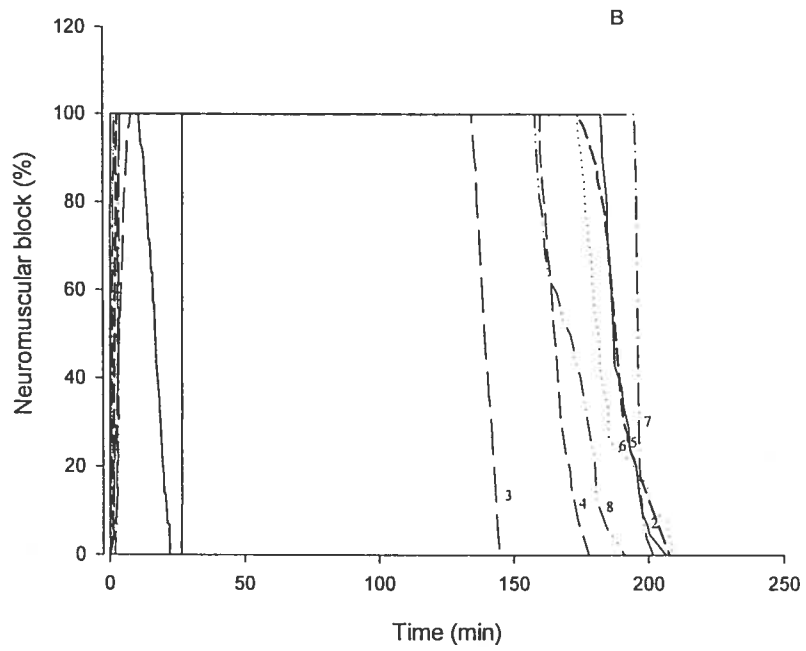
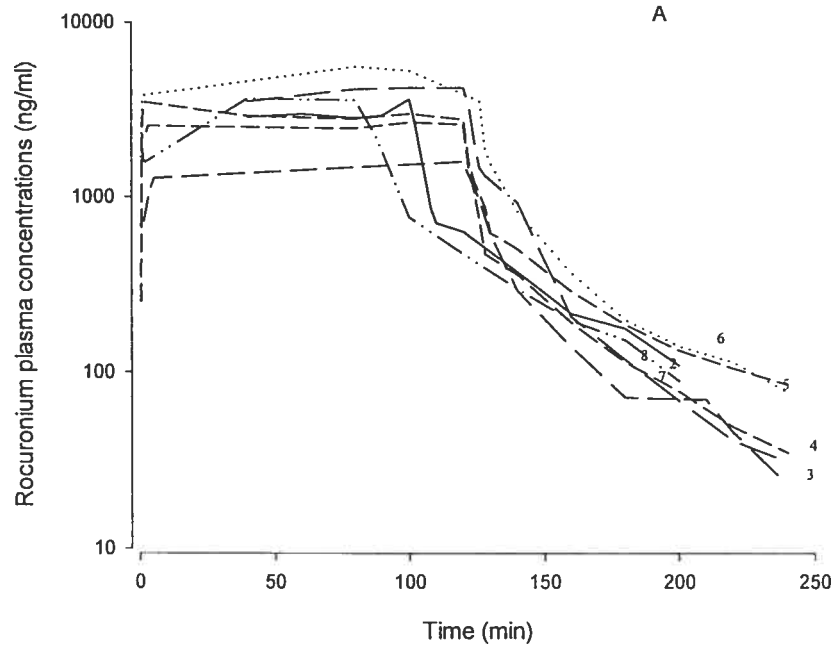


FIGURE LEGENDS

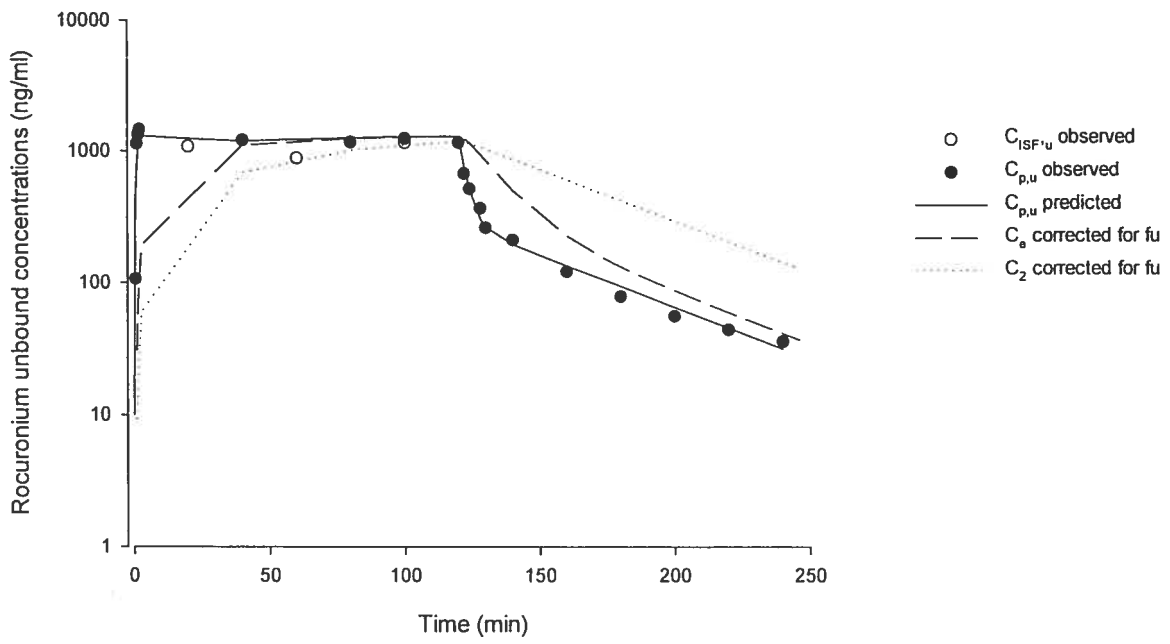
Figure 1: (A) Individual Rocuronium Plasma Concentration-versus-Time Curves
(B) Individual Neuromuscular Effect of Rocuronium in Individual Dogs

Figure 2: (A) Observed versus Predicted Rocuronium Plasma concentrations,
Predicted Peripheral and Effect Compartment Concentrations and
Interstitial Tissue Concentrations in Dog 5 (B) Observed versus
Predicted Neuromuscular Effect of Rocuronium in Dog 5

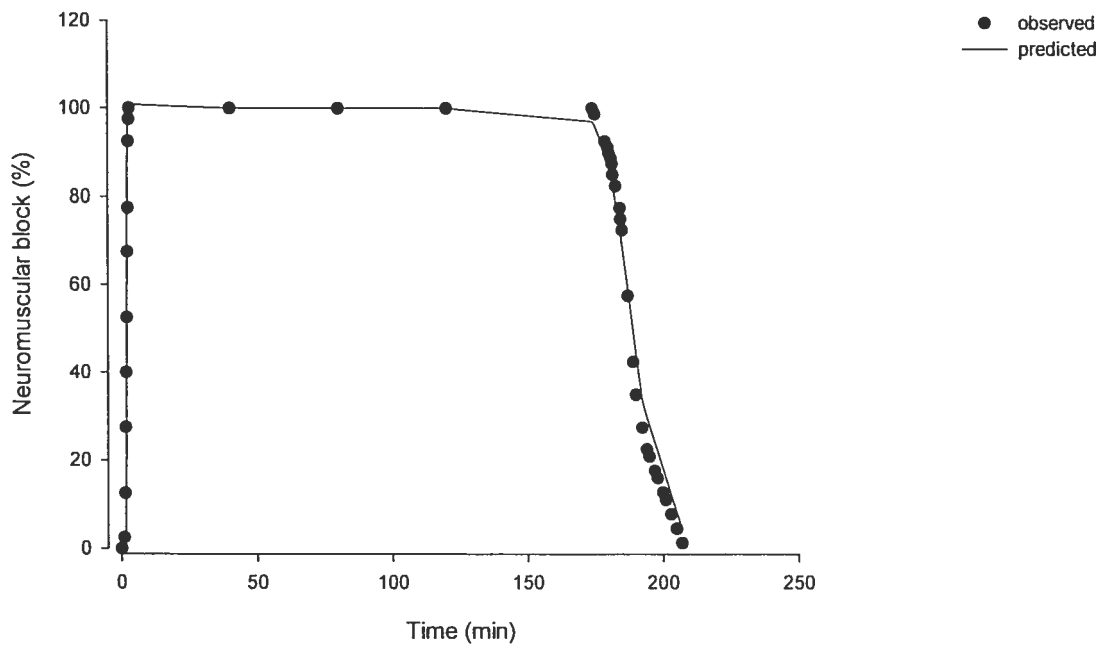




A



B



REFERENCES

1. Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 1981; 6(6):429-453.
2. Proost JH, Mirakhur RK, Eriksson LI, Roest J, Wierda JM. Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans. *Br J Anaesth* 2000; 85:717-723.
3. Ali HH, Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. *Anesthesiology* 1976; 45(2):216-249.
4. Ezzine S, Varin F. Determination of interstitial rocuronium concentrations in the muscle tissue of anesthetized dogs by microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 49:121-129.
5. Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method. *Pharm Res* 1998; 15(11):1673-1679.
6. Ducharme J, Varin F, Bevan DR, Donati F, Theoret Y. High-performance liquid chromatography-electrochemical detection of vecuronium and its metabolites in human plasma. *J Chromatogr* 1992; 573:79-86.
7. Cameron M, Donati F, Varin F. In vitro plasma protein binding of neuromuscular blocking agents in different subpopulations of patients. *Anesth Analg* 1995; 81(5):1019-1025.
8. Hartley HO. The modified Gauss-Newton method for fitting of non-linear regression functions by least squares. *Technometrics* 1961; 3:269-280.
9. Davies M, Whitting I. Modified form of levenberg's correction, numerical methods for non-linear optimization. London: Academic Press, 1972.

10. Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics. In: Gibaldi M, Perrier D, editors. *Pharmacokinetics*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1982:27-279.
11. Sheiner LB, Stanski DR, Vozech S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 25(3):358-371.
12. Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 1981; 6(6):429-453.
13. Dragne A, Varin F, Plaud B, Donati F. Rocuronium pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship under stable propofol or isoflurane anesthesia. *Can J Anaesth* 2002; 49(4):353-360.
14. Marshall RJ, Muir AW, Sleigh T, Savage DS. An overview of the pharmacology of rocuronium bromide in experimental animals. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1994; 9:9-15.
15. Wierda JM, Proost JH, Schiere S, Hommes FD. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/dynamic relationship of rocuronium bromide in humans. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1994; 9:66-74.
16. Plaud B, Proost JH, Wierda JM, Barre J, Debaene B, Meistelman C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium at the vocal cords and the adductor pollicis in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58(2):185-191.
17. Nolting A, Costa TD, Vistelle R, Rand KH, Derendorf H. Determination of free extracellular concentrations of piperacillin by microdialysis. *J Pharm Sci* 1996; 85(4):369-372.
18. Kovar A, Dalla CT, Derendorf H. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J Pharm Sci* 1997; 86(1):52-56.

19. Sasongko L, Ramzan I, Williams KM, McLachlan AJ. Muscle distribution of the neuromuscular blocker gallamine using microdialysis. *J Pharm Sci* 2002; 91(3):769-775.
20. De La Pena A, Dalla CT, Talton JD, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U et al. Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. *Pharm Res* 2001; 18(9):1310-1314.
21. Roy J, Varin F. Physicochemical properties of neuromuscular blocking agents and their impact on the PK-PD relation. *Br J Anaesth* 2004; 93:1-8.
22. Fuchs-Buder T, Strowitzki M, Rentsch k, Schreiber JU, Philippe-Osterman S, Kleimschmidt S. Concentrations of rocuronium in cerebrospinal fluid of patients undergoing cerebral aneurysm clipping. *Br J Anaesth* 2004; 92:419-421.

3.4 Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relation of Mivacurium in Anesthetized Dogs

Samia Ezzine, D.Pharm, M.Sc⁹ and France Varin, B.Pharm, Ph.D¹⁰

Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence should be addressed to:

Dr France Varin
Faculté de pharmacie
Université de Montréal
2900 Edouard Montpetit
C.P. 6128, succursale centre-ville
Montréal (Québec)
H3C 3J7
Canada
Tél: 514-343 7016, Fax : 343-5735
[REDACTED]

The work was performed at the Faculté de pharmacie, Université de Montréal

Funding: This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant MA-10274). A CIHR-R&D studentship was awarded to Samia Ezzine.

⁹ Ph.D student, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

¹⁰ Professor, Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

Acknowledgment: The authors would like to thank Ms. Johanne Couture and Ms. Sanae Yamaguchi, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, for their technical assistance.

Running Head: PK-PD of mivacurium in anesthetized dogs

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to characterize the pharmacokinetics, pharmacodynamics and the concentration-effect relation of the three isomers of mivacurium in anesthetized dogs.

Methods: After approval by the Animal Care Committee, eight adult male dogs with a body weight ranging from 7-21 kg were anesthetized with pentobarbital. Following mivacurium administration via the right jugular vein, arterial blood samples were collected at different time-points (depending on the dosing regimen). Neuromuscular function was monitored using train-of four stimulation until full recovery.

Results: All dogs had a profoundly slower clearance (approximately 8 times) and a markedly longer $t_{1/2\beta}$ compared to that reported in humans for the two active isomers of mivacurium, *cis trans* and *trans trans*.

Conclusion: A fundamental difference could exist in the activity and/or the affinity of the canine plasma cholinesterase to mivacurium.

INTRODUCTION

Mivacurium chloride is a short-acting, non depolarising neuromuscular blocking agent. It consists of three stereoisomers, *trans-trans* (57%), *cis trans* (36%) and *cis cis* (7%). The most active isomers, *trans trans* and *cis trans* possess similar neuromuscular blocking potencies in humans.¹⁻³ However, the *cis cis* isomer has only one-tenth of the neuromuscular activity of the two other isomers in cats and monkeys.⁴

Mivacurium pharmacokinetics was investigated in humans and dogs. A rapid systemic clearance and a short elimination half-life of the two active isomers of mivacurium has been reported in humans^{5,6} either after a bolus or a constant infusion administration. However, a discrepancy was found in the pharmacokinetic parameters derived in the dog. Either a short⁷ or a long half-life⁸ of the two active isomers of mivacurium were reported after a bolus dose administration in dogs. These findings are surprising since the two active isomers of mivacurium are susceptible to metabolism by plasma cholinesterase (pseudocholinesterase),² and has been recently shown to undergo elimination in the muscle tissue of anesthetized patients,⁹ resulting in extremely rapid clearance from the systemic circulation.

The objective of this study was to characterize the pharmacokinetics, pharmacodynamics and the concentration-effect relation of the three isomers of mivacurium in anesthetized dogs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The three isomers of mivacurium chloride as well as laudanoline (internal standard), were kindly supplied by GlaxoWellcome (Stevenage, Hertfordshire, United Kingdom). All organic solvents were high-performance liquid chromatography grade (Anachemia, Montréal, Québec, Canada).

Animal Preparation

Animals

After approval by the Animal Care Committee, seven adult male dogs with a body weight ranging from 7-21 kg were obtained from Biolab (Montreal, Quebec, Canada). The animals were singly housed and maintained under a 12 hour light-dark cycle at $70 \pm 5^{\circ}\text{F}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity. Food and water were freely available except before the 24h covering the day of the experiment. Experiments in this study were carried out according to the Canadian Council on Animal Care.

General Anesthesia

On the day of the experiment, each dog was anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol[®], Abbott Laboratories, Montreal, QC), 30 mg/kg iv. The animals were mechanically ventilated using a ventilator (Model 607, Harvard, South Natick, MA.) Monitoring of the level of anaesthesia was based on hemodynamic parameters as well as the corneal reflex. A 4 mg/kg intermittent bolus dose was administered for maintenance of deep anaesthesia (approximately every 90 min). All invasive procedures were carried out before administration of mivacurium. Thereafter, blood pressure and cardiac monitoring was used to monitor depth of anesthesia.

Surgical Procedure and Hemodynamic Monitoring

Once a satisfactory level of anaesthesia was achieved and physiological parameters were stable, the right jugular vein was cannulated for drug infusion and the right carotid artery for blood sampling. Blank plasma collected on sodium citrate 0.129 M was used for protein binding and dog's phenotype for pseudocholinesterase. A three-way stopcock was installed on the arterial line for arterial blood pressure monitoring. In the left femoral artery, an electromagnetic flow probe (3 mm i.d, model FR-030T, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) was installed and connected to a polygraph system (model RM-6000, Nihon Kohden) for muscle blood flow measurement. In the femoral vein of the same leg, an indwelling catheter (Cathelon[®], Critikon, Tampa, Florida) was inserted to allow venous blood sampling. Heart rate was monitored via the arterial pulse, and body temperature was monitored by means of rectal probe maintained at 38°C during the experimental procedure.

Neuromuscular Monitoring

The medial cutaneous antebrachial nerve was stimulated supramaximally at the right forelimb through surface electrode with 0.2 msec, 40 to 70 mA impulses derived at a frequency of 2 Hz. This pattern is repeated every 12 seconds. The resulting force of contraction is measured using a force transducer (Grass F-10,). A stabilisation period of at least 5 min was allowed before injection of mivacurium. Muscle relaxation was monitored continuously until full recovery. The degree of neuromuscular block was expressed as the percentage of twitch height depression relative to the baseline values obtained immediately before the injection of mivacurium (onset) or after complete recovery (recovery).

Steady State Period

Drug Administration

Infusion regimens of mivacurium were different in each dog. The number of mivacurium doses , the rate and the length of infusion are presented in table I.

Sample Collection

Arterial and venous blood samples (3 ml) were collected simultaneously at 40, 80, 120, 160 and 200 min (depending of the length of the perfusion) after the beginning of mivacurium perfusion. These collection periods (at least three) were used to confirm steady state equilibrium. Plasma samples were collected on echothiophate to prevent the hydrolysis of mivacurium by plasma cholinesterase. Samples were kept on ice and stored at -70°C pending HPLC analysis.

PK-PD Period

At the end of the steady state period, arterial plasma (3 ml) was collected. Blood sampling times were scheduled for each dog according to their respective length of infusion. The collection times were frequent for the first minutes and covered at least 5 half-lives, thereafter. Blood samples were collected on echothiophate, kept on ice, centrifuged and plasma frozen at -70°C pending HPLC analysis.

***In vitro* Protein Binding**

An ultrafiltration technique was performed in duplicate on spiked plasma using 30,000 μ membranes as previously described.¹⁰ The ultrafiltration devices containing 0.5ml of the biological matrix were centrifuged at 1900 g for 5 minutes at room temperature. An aliquot (50 μ l) of the ultrafiltrate was acidified with sulfuric acid 2 M (μ l) and frozen. Thawed ultrafiltrates were diluted with blank plasma and processed in the same manner as plasma samples for HPLC analysis. Mivacurium unbound fraction (f_u) was calculated from the ultrafiltrate concentration / total concentration ratio.

Phenotyping of Dog's Plasma:

Each dog's phenotype was characterized using the conventional laboratory methods, by measurement of cholinesterase activity and biochemical inhibition reactions, such as dibucaine number, fluoride number and chloride number.¹¹ The analyses were conducted in the biochemistry laboratory at Maisonneuve-Rosemont Hospital.

Sample Analysis

Arterial and venous plasma samples were assayed for mivacurium isomers concentration by a reversed phase HPLC method coupled with fluorescence detection. This method was adapted from that previously reported for cisatracurium and its metabolites in human urine.¹² Plasma samples, assayed in duplicate, were extracted on Bond Elut phenyl solid-phase extraction cartridges (Varian, Harbor city, CA, USA), already conditioned with acetonitrile and 5mM sulphuric acid.

The plasma sample and its internal standard (laudanidine $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) were aspirated through the sorbent. A vacuum of 50-80 kPa was applied to the manifold of the Vac-Elut chamber (Analytichem international, Harbor city, CA, USA) through the extraction procedure. The cartridges were washed sequentially with 5 mM sulphuric acid and a mixture of methanol:water (50:50). Analytes were eluted with 80 mM sodium sulphate in 5 mM sulphuric-acid: acetonitrile (40:60). The eluents were then reduced to half of their volume by evaporation using a Speed-Vac concentrator (Model SC210 A, Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA). Aliquots were injected directly into the HPLC system.

A constametric 4100 pump (LDC Analytical, Riviera Beach, FL, USA) was programmed to deliver, at 2.0 ml min^{-1} , 14mM sodium sulfate in 0.5 mM sulphuric acid:acetonitrile (40:60) for 5 min followed by 70 mM sodium sulfate in 0.5 mM sulphuric acid:acetonitrile (40:60) for 6 min, returning to the initial condition to re-equilibrate for 3 min. Separation of mivacurium isomers was achieved using a $5 \mu\text{m}$ CN spherisorb strong cation exchanger column (150 x 4.6 mm I.D, Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintained at 50°C with a column heater (CH-30, Eppendorf North America Inc., Madison, WI, USA). Detection of mivacurium isomers was accomplished using a Hewlett Packard 1046 fluorescence detector (Hewlett Packard, Waldbroom, Germany) at excitation and emission wavelengths of 202 and 320 nm, respectively. Chromatographic data were recorded and processed with an integrator (Shimadzu C-R3A, Koyoto, Japan). Under the conditions described, the method proves to be sensitive, with a lower limit of quantification of 5 ng ml^{-1} for each isomer of mivacurium. The assay proved to be linear up to 5000 ng ml^{-1} for the isomers of mivacurium. The coefficient of determination (r^2) was always higher than

0.99. The method proved to be reproducible for each analyte, with a coefficient of variation always less than 10% over the linear range.

Pharmacokinetic Analysis

For each isomer of mivacurium, parameter estimation was accomplished by fitting the plasma data to a two-compartment mamillary model with a zero order input rate and elimination from the central compartment, using a non-linear least square computer (WinNonLin® software Pharsight Scientific Consulting, Mountain View, CA) that applied a linear regression to all data points. A two-compartment model was selected after standard verification of its adequacy using Akaike criteria (AIC). Point estimates and pharmacokinetic parameters were optimized for each dog using a standard minimization method. A weighting function of $1/(\text{predicted } y)^2$ was applied.

The following parameters were derived for each isomer using standard formulae : A, B, the coefficient, α , β , the fast distribution and elimination rate constants, V_1 , V_2 , V_{ss} , the central, peripheral and total apparent volume of distribution at steady state and CL, the total body clearance, k_{12} , k_{21} the transfer rate constants between the peripheral and central compartment. *Cis cis* mivacurium concentrations were not always detectable in plasma (below the limit of quantification). Therefore, concentrations were not fitted into a pharmacokinetic model or at least to a classic linear one-compartment model.

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis

When performing parametric PK-PD modeling for a drug having more than one pharmacological entity, one has to derive the pharmacological concentration to which the effect will be linked. Since the *cis cis* isomer accounts only for 6% of the total administered dose and its potency in animals is about tenfold smaller than that of the equipotent isomers (*trans trans* and *cis trans*)⁴, PK-PD modeling has been carried out with the underlying assumption that mivacurium pharmacological concentration is the sum of *trans trans* and *cis trans* only. Hence, the pharmacological dose used in PK-PD modeling corresponds to the sum of respective doses of *trans trans* (57%) and *cis trans* (36%). Using the pharmacokinetic parameters previously derived for the mivacurium pharmacological concentrations, a

parametric link model¹³ coupled to a sigmoid E_{\max} model were used to derive the equilibrium rate constant between the central and the effect compartment (k_{eo}), the effect compartment concentration at 50 % block (EC_{50}) and the slope of the sigmoid curve (γ). The WinNonlin software was used for all PK-PD analyses. A weighting function of 1 was applied and the goodness of fit was assessed by the Akaike information criterion.

RESULTS

The different perfusion regimens of mivacurium administered to each of our dogs are presented in Table I. Dogs 1, 2 and 4 received 2 sequential doses (without a recovery period). Dog 5 received only one dose, dogs 6 and 7 received 2 doses. Dog 3 received 3 independent doses (after full recovery). In these dogs, the second dose of mivacurium was administered once the dog has recovered from neuromuscular blockade.

Individual physiological parameters such as arterial pressure and muscle blood flow are presented in table II.

Plasma cholinesterase activity was within reference limits for all 7 dogs. Mean cholinesterase activity, as measured by dibucaine and chloride number, was 0.2 U and 0.06 U, respectively.

Pharmacokinetic parameters of the three isomers of mivacurium are presented in Table III. As plasma concentrations of the *cis cis* isomer were not detectable in all dogs, pharmacokinetic parameters were derived only for dogs 1, 2 and 7. Predicted disposition and elimination phases versus true plasma concentrations of the *cis trans* and *trans trans* isomers were presented for dog 2 (Figure 1). Despite the different perfusion regimens, mean half-life in all dogs was 50 min, with a minimum of 31min and a maximum of 138 min. Mean steady state volume of distribution was approximately 0.3 L/kg.

Pharmacodynamic parameters are presented in Table IV. Mean onset time was 8 min and the mean recovery index was 16.3 min.

PK/PD parameters are presented in Table V. Mean EC_{50} was 25 ng/ml and mean k_{e0} was 0.06 min^{-1} .

DISCUSSION

This study represents the first attempt to characterize the concentration-effect relation of the three isomers of mivacurium in anesthetized dogs. We found that all dogs had profoundly a slower clearance (approximately 8 times) and a markedly longer $t_{1/2\beta}$ compared to that reported in humans for the two active isomers, *cis trans* and *trans trans*.

Steady state clearance in humans of the three mivacurium isomers during an infusion-based study was reportedly 3.8 ± 0.7 , 106 ± 36 and 57 ± 18 ml/min/kg for the *cis cis*, *cis trans* and *trans trans* isomers, respectively.¹⁴ In another infusion-based study, Cook et al¹⁵ reported clearance in healthy humans for all three isomers to be 70 ± 28 ml/min/kg. In a bolus based study, Laurin et al⁶ reported a clearance of 25 ± 6.2 , 32 ± 6.7 and 7 ± 1.3 ml/min/kg in young adult humans, for the *trans trans*, *cis trans* and *cis cis* isomers, respectively. In the study reported here, we determined clearance in healthy dogs that was approximately 5 to 21 times slower than that reported in humans for the two active isomers.

Similarly, in this study, we found a markedly longer $t_{1/2\beta}$ than that reported in humans for the two active mivacurium isomers. In healthy humans, $t_{1/2\beta}$ is approximately 2 and 3 min for *trans trans* and *cis trans* isomers, respectively.¹⁶ Elimination half-life for the two active mivacurium isomers appears to be approximately 20 times longer in the dogs of this study.

Our results are in good agreement with the study of Smith et al conducted in dogs⁸. After a bolus dose administration, they reported a slow clearance, 12 and 15 ml/min/kg for the *cis trans* and *trans trans* isomers, respectively. Accordingly, they found a long $t_{1/2\beta}$; 35 and 43 min for *trans trans* and *cis trans* isomers, respectively. In another study conducted in beagle dogs⁷, a slow clearance (20 ml/min/kg and 14 ml/min/kg for *cis trans* and *trans trans*, respectively), but a short $t_{1/2\beta}$ (approximately 4 min for the two isomers) were reported. Despite the similar volume of distribution found in these two animal studies (0.3 L/kg and 0.2 L/kg for *cis trans* and *trans trans*, respectively), it is surprising to report different terminal half-lives.

In the current study, the volume of distribution at steady state was found to be 0.28 L/kg for the *cis trans* and *trans trans* isomers and appear to be similar between dogs and humans. It is expected that V_d would be essentially the same in both species, assuming typical fluid homeostasis, given mivacurium's high water solubility and polarity and lack of appreciable uptake into nonaqueous body compartments.

The rapid systemic clearance of mivacurium active isomers found in humans was explained by a hydrolysis in the peripheral tissues. In fact, we have demonstrated in a recent report, that as much as 40% of these isomers are hydrolyzed during their passage in the forearm in anesthetized patients.⁹ Although it has been shown that plasma cholinesterase is present in the beagle dog¹⁷ and in the cerebrospinal fluid of monkeys and pigs,¹⁸ it seems likely that the enzyme activity is lower in dogs compared to humans. This suggestion was supported by the results of the test of dibucaine number. In fact, plasma cholinesterase activity in our dogs ranged from 76 to 79 % of the human values and could explain, at least in part, the longer half-life and the corresponding slower clearance in dogs. Also, it is not excluded that a fundamental difference exists in the affinity of the canine plasma cholinesterase activity for the three isomers of mivacurium. It was suggested that there is a specie difference in the manner by which the enzyme hydrolyzes the bulky mivacurium molecule.⁸

To our knowledge, the concentration-effect relation of mivacurium has never been characterized in dogs. In the literature, the concentration-effect relation of mivacurium has been established in rats after a 2.5 min intravenous infusion of 0.6 mg/kg.¹⁹ However, this PK-PD study has been established for the racemic mixture of mivacurium.

When performing parametric PK-PD modeling for a drug having more than one pharmacological entity, one has to derive the pharmacological concentration to which the effect will be linked. Since the *cis cis* isomer accounts only for 6% of the total administered dose and its potency in animals is about tenfold smaller than that of the equipotent isomers (*trans trans* and *cis trans*)⁴, PK-PD modeling has been carried out with the underlying assumption that mivacurium pharmacological concentration is the sum of *trans trans* and *cis trans* only. By doing so, we found that the onset time of mivacurium in dogs was similar to that in humans (8 min and 5.6 min,

respectively).⁶ However, the recovery from neuromuscular blockade in dogs was approximately 10 times slower than that in humans. This discrepancy could be explained either by the input rate (bolus vs infusion) or the slower clearance of mivacurium in dogs. The biological half-life of mivacurium was three-fold longer than the "pharmacological half-life" estimated by the 25-75% recovery index. These results suggest that the recovery from the neuromuscular blockade is governed mostly by the redistribution from tissues.

When comparing the PK-PD parameters in dogs and humans, it is essential to consider that these parameters were estimated using a peripheral link model in humans.²⁰ The equilibrium rate constant (k_{e0}) was quite similar in dogs and humans (0.06 vs 0.1 min^{-1}). However, the EC_{50} was five-fold lower in dogs (25 ng/ml vs 130 ng/ml) indicating that the dog could be more sensitive to mivacurium than humans. The difference in EC_{50} between dogs and humans could be explained, at least in part, by the different input rates and / or administered doses as previously demonstrated by Bergeron et al²¹.



CONCLUSION

This is the first study dealing with the concentration-effect relation of mivacurium in dogs. Our results demonstrate that the two active isomers of mivacurium (*cis trans* and *trans trans*) show different pharmacokinetic behavior compared to humans. The slow systemic clearance could be explained by a slower plasma cholinesterase activity and/or the manner by which the enzyme hydrolyzes the bulky mivacurium molecule. It seems likely that dogs are more sensitive to mivacurium than humans.



FIGURE LEGENDS

Figure 1: Observed versus Predicted Mivacium Plasma Concentrations in Anesthetized Dogs

Table I. Mivacurium Administered Doses in Anesthetized Dogs

Dog	Weight	Number of doses	Dose 1			Dose 2			Dose 3		
			Infusion rate ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$)	Length (min)		Infusion rate ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$)	Time (min)	Length (min)	Infusion rate ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$)	Time (min)	Length (min)
<i>Sequential administration</i>											
1	13.8	2	150	3	5	3	123				
2	8.8	2	200	3	7	3	210				
4	8	2	15	3	3	3	200				
5 ^a	7.7	1	5	5							
<i>Independent administration (recovery period)</i>											
3	8.2	3	15	0.03	1	172	20	3	322	120	
6	7.2	2	3	8	1	112	120				
7	21.7	2	1	120	15	250	0.03				

a: Dog 5 received only one dose

Table II. Physiological Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	Weight (Kg)	Arterial pressure (mm Hg)	Muscle blood flow (ml/min/kg)
1	13.8	109 ± 5 / 91 ± 2	4.3 ± 1.8
2	8.8	79 ± 13 / 61 ± 13	4.7 ± 0.5
3	8.2	162 ± 4 / 132 ± 4	3.3 ± 0.2
4	8	111 ± 7 / 95 ± 8	4.7 ± 1
5	7.7	177 ± 3 / 137 ± 3	2.8 ± 0.1
6	7.2	111 ± 6 / 92 ± 7	2.2 ± 0.1
7	21.7	166 ± 14 / 127 ± 5	4.6 ± 0.4

Table III. Mivacurium Pharmacokinetic Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	Curve parameters		Microconstants		PK parameters				
	A (ng/ml)	B (ng/ml)	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)	K ₂₁ (min ⁻¹)	K ₁₂ (min ⁻¹)	V ₁ (L/kg)	CL (ml/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
<i>trans trans mivacurium</i>									
1	714	59	0.095	0.014	0.020	0.023	0.010	6.8	0.223
2	2495	96	0.106	0.005	0.009	0.039	0.044	2.8	0.230
3	143	11	0.262	0.008	0.026	0.167	0.051	4.2	0.409
4	446	11	0.641	0.019	0.033	0.269	0.019	6.7	0.169
5	112	47	0.302	0.022	0.105	0.156	0.090	5.7	0.223
6	153	20	0.121	0.014	0.026	0.045	0.079	5.0	0.215
7	1010	93	1.010	0.018	0.102	0.743	0.062	11.4	0.515
mean	725	48	0.362	0.014	0.046	0.206	0.05	6.1	0.28
s.d.	850	36	0.343	0.006	0.040	0.253	0.03	2.7	0.13
<i>cis trans mivacurium</i>									
1	504	71	0.086	0.013	0.022	0.016	0.088	4.5	191
2	980	82	0.061	0.005	0.01	0.023	0.068	2.3	226
3	92	14	0.268	0.008	0.042	0.183	0.051	2.6	270
4	296	11	0.558	0.016	0.035	0.285	0.018	4.5	163
5	53	40	0.227	0.041	0.121	0.07	0.096	7.4	152
6	90	25	0.110	0.013	0.034	0.047	0.075	3.1	176
7	572	34	0.579	0.011	0.043	0.397	0.071	10.8	731
Mean	370	40	0.270	0.015	0.044	0.146	0.07	5.0	273
s.d.	340	27	0.217	0.012	0.036	0.148	0.03	3.1	206
<i>Cis cis mivacurium</i>									
1	63	17	0.105	0.016	0.034	0.039	0.113	5.7	236
2	114	9	0.049	0.004	0.007	0.019	0.097	2.6	347
7	592	33	0.848	0.006	0.051	0.7	0.012	1.21	170
Mean	256	20	0.334	0.009	0.031	0.253	0.07	3	251
s.d.	292	12	0.446	0.006	0.022	0.388	0.05	2	89

α , initial distribution rate constant; β , terminal elimination rate constant; k_{12} , transfer rate from the first to the second compartment
 k_{21} , transfer rate constant from the second to the first compartment; V_1 , apparent volume of distribution in the central compartment
 V_{ss} , apparent volume of distribution at steady state; CL , total body clearance.

Table IV. Mivacurium Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	Onset time (min)	T _{25%} (min)	T _{50%} (min)	T _{75%} (min)	I ₂₅₋₇₅ (min)
1	3.0	366	377	396	30
2	2.4	N/D	N/D	N/D	N/D
3*	5.7	39	41	44	5
3*	8.5	65	70	74.5	9.5
3*	4.0	N/D	N/D	N/D	N/D
4	4.2	374	386	401	27
5	4.8	65.4	69	73.5	8.1
6*	9.4	68.2	75.6	84.6	16.4
6*	12.4	235	245	257	22
7*	31.0	173	181	190	17
7*	2.3	26.5	33.2	38.5	12
mean	8.0	156.9	164.2	173.2	16.3
SD	8.6	121.7	124.5	128.4	7.4

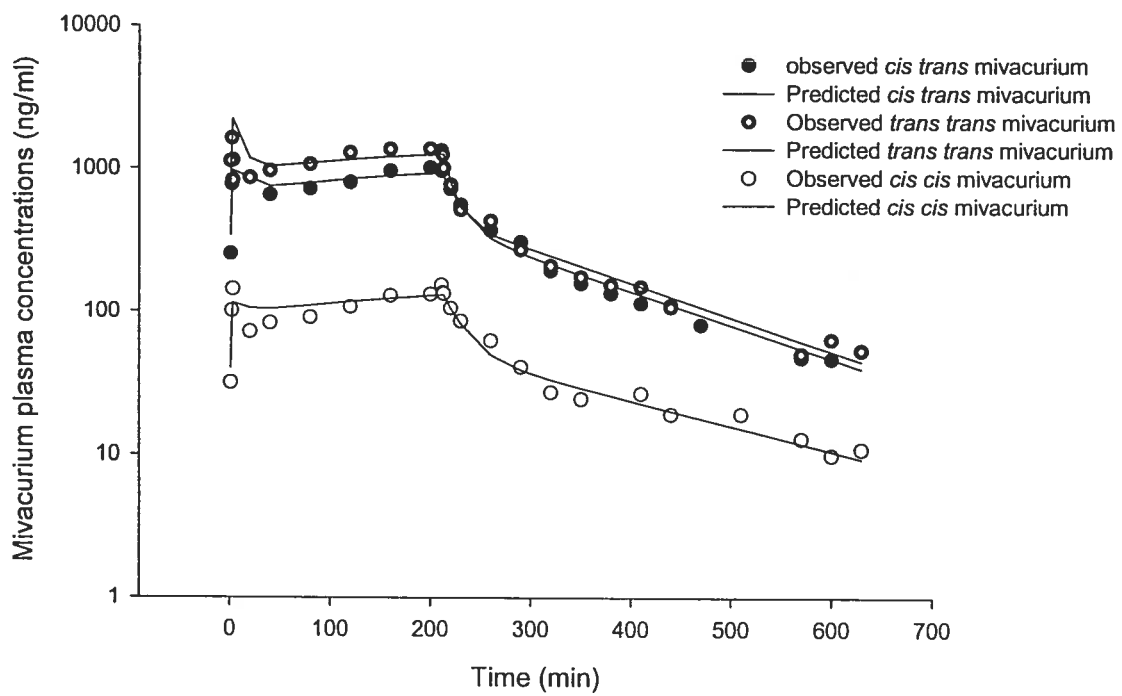
Onset, time at 90% neuromuscular block; T_{25%}, T_{50%}, T_{75%}, time to 25%, 50% and 75% recovery, respectively; I₂₅₋₇₅, recovery index

* PD parameters were determined for each administered dose of mivacurium

Table V. Mivacurium Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Parameters in Anesthetized Dogs

Dog	EC ₅₀ (ng/ml)	Gamma	K _{eo} (min ⁻¹)
1	24.90	5.96	0.0213
3	24.22	4.25	0.0802
4	23.69	5.27	0.0306
5	20.99	9.49	0.0699
6	28.91	6.52	0.0397
7	25.60	2.30	0.1260
Mean	25	5.63	0.0613
SD	3	2.41	0.0391

K_{eo}, effect compartment equilibration rate constant; EC₅₀, effect compartment concentration at 50 % block; gamma, slope factor.



REFERENCES

1. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of mivacurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 1994; 80(6):1296-1302.
2. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RP, Sunder N et al. The clinical neuromuscular pharmacology of mivacurium chloride (BW B1090U). A short-acting nondepolarizing ester neuromuscular blocking drug. *Anesthesiology* 1988; 68(5):723-732.
3. Frampton JE, McTavish D. Mivacurium. A review of its pharmacology and therapeutic potential in general anaesthesia. *Drugs* 1993; 45(6):1066-1089.
4. Maehr R.B, Belmont MR, Wray DL, Savarese JJ, Wastila B. Autonomic and neuromuscular effects of mivacurium and isomers in cats. *Anesthesiology* 1991; 75:A772.
5. Lacroix M, Donati F, Varin F. Pharmacokinetics of mivacurium isomers and their metabolites in healthy volunteers after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 1997; 86(2):322-330.
6. Laurin J, Donati F, Varin F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium in young and elderly adult patients after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 2004 (accepted with minor revision).
7. Lugo SI, Liang Z, Eddington ND. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium stereoisomers in beagle dogs using twitch height and train-of-four response. *Biopharm Drug Dispos* 1998; 19(8):485-491.
8. Smith LJ, Schwark WS, Cook DR, Moon PF, Looney AL. Pharmacokinetic variables of mivacurium chloride after intravenous administration in dogs. *Am J Vet Res* 1999; 60(9):1051-1054.

9. Ezzine S, Donati F, Varin F. Mivacurium arteriovenous gradient during steady state infusion in anesthetized patients. *Anesthesiology* 2002; 97(3):622-629.
10. Cameron M, Donati F, Varin F. In vitro plasma protein binding of neuromuscular blocking agents in different subpopulations of patients. *Anesth Analg* 1995; 81(5):1019-1025.
11. Longpre J. [Qualitative and quantitative measurement of the activity of pseudochoolinesterases]
Mesure qualitative et quantitative de l'activite des pseudochoolinesterases. *Can J Med Technol* 1971; 33(6):213-227.
12. Bryant BJ, James CD, Cook DR, Harrelson JC. High Performance Liquid Chromatography Assay For Cisatracurium And its Metabolites in Human Urine. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 1997; 20 (13):2041-2051.
13. Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 25(3):358-371.
14. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the three isomers of mivacurium in health, in end-stage renal failure and in patients with impaired renal function. *Br J Anaesth* 1995; 75(1):31-36.
15. Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S et al. Pharmacokinetics of mivacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. *Br J Anaesth* 1992; 69(6):580-585.
16. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 1994; 73(5):613-618.

17. Scarsella G, Toschi G, Bareggi SR, Giacobini E. Molecular forms of cholinesterases in cerebrospinal fluid, blood plasma, and brain tissue of the beagle dog. *J Neurosci Res* 1979; 4(1):19-24.
18. Ummenhofer WC, Brown SM, Bernards CM. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are expressed in the spinal meninges of monkeys and pigs. *Anesthesiology* 1998; 88(5):1259-1265.
19. Troconiz IF, Garrido MJ, Garcia E, Suarez E, Calvo R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of mivacurium in rats. *J Pharm Sci* 1997; 86(2):252-256.
20. Laurin J, Donati F, Nekka F, Varin F. Peripheral link model as an alternative for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of drugs having a very short elimination half-life. *J Pharmacokinet Biopharm* 2001; 28(1):7-25.
21. Bergeron L, Bevan DR, Berrill A, Kahwaji R, Varin F. Concentration-effect relationship of cisatracurium at three different dose levels in the anesthetized patient. *Anesthesiology* 2001; 95(2):314-323.

4 Discussion générale

4.1 Gradient artérioveineux du mivacurium chez le patient anesthésié

Lorsqu'un état d'équilibre s'installe durant une perfusion continue, les concentrations artérielles et veineuses au niveau de l'avant-bras d'un patient sont considérées comme égales puisque le transfert de masse entre le compartiment sanguin et les tissus est devenu nul. Cet énoncé général n'est pas valable dans le cas d'un métabolisme ou d'une séquestration du médicament lors de son passage à travers le tissu.²³¹ En déterminant le gradient artérioveineux du mivacurium à l'état d'équilibre chez le patient anesthésié, nous avons révélé que la concentration veineuse des isomères actifs du mivacurium était deux fois moins élevée que la concentration artérielle.

Selon nos résultats, l'extraction musculaire des isomères actifs du mivacurium a été évaluée à 40 % approximativement. Nous avons attribué cette différence de concentrations de part et d'autre du tissu musculaire à une élimination irréversible du mivacurium lors de son passage dans la microcirculation de l'avant bras, site des prélèvements sanguins. En se basant sur des paramètres physiologiques tels que le débit sanguin musculaire chez le patient anesthésié, nous avons émis l'hypothèse que le mivacurium est majoritairement dégradé dans l'espace extravasculaire. Les propriétés physicochimiques du mivacurium laissent croire que la distribution de cet ammonium quaternaire est confinée à l'espace extracellulaire. De plus, l'éventuelle présence de la cholinestérase plasmatique dans le liquide interstitiel nous laissent suggérer qu'une dégradation enzymatique par la cholinestérase plasmatique serait responsable du gradient artério-veineux observé à l'état d'équilibre. Nous avons également évalué que la clairance musculaire du mivacurium représentait jusqu'à 16% de la clairance systémique totale. Cette clairance musculaire relativement faible comparativement à l'importance de l'extraction musculaire s'explique par le fait que seulement 15 % du débit sanguin corporel est délivré au muscle.

En considérant l'importance de l'extraction musculaire du mivacurium, on pouvait s'attendre à ce que les métabolites monoester et alcool issus de la dégradation

enzymatique du mivacurium soient plus élevés dans le sang veineux. Cependant, nos résultats démontrent que les concentrations artérielles et veineuses de ces métabolites sont semblables. Cette apparente discordance s'explique par le fait que la vitesse de formation des métabolites est 50 fois plus rapide que leur vitesse d'élimination, estimée à 100 min dans une autre étude pharmacocinétique chez le patient anesthésié.⁹⁵

Nos recherches démontrent que prélever du sang veineux pour une évaluation pharmacocinétique du mivacurium occasionnerait une surestimation de certains paramètres tels que la clairance et le volume de distribution. Puisque la clairance systémique est un paramètre fréquemment utilisé par l'anesthésiste pour ajuster le régime de perfusion du mivacurium chez son patient, il pourrait en résulter une augmentation proportionnelle des concentrations artérielles et donc de la durée prévue de l'effet clinique.

En effet, les régimes de perfusion du mivacurium requis pour maintenir un état stable de bloc neuromusculaire sont reconnus comme très variables chez les patients anesthésiés.²³²⁻²³⁴ Nos résultats suggèrent que cette variabilité, souvent attribuée au polymorphisme génétique de la cholinestérase plasmatique,²³⁵ pourrait également résulter d'une hydrolyse tissulaire importante.

Une hydrolyse tissulaire importante associée au polymorphisme génétique de la cholinestérase plasmatique s'ajoutent à la complexité physico-chimique du mivacurium. C'est pourquoi il est très difficile de caractériser la relation concentration-effet du mivacurium. Afin de vaincre ces difficultés, il a été proposé d'une part, d'inclure une constante d'élimination au compartiment périphérique (compartiment 2 dans un modèle pharmacocinétique bicompartimental)¹⁴¹ et d'autre part, de lier l'effet pharmacologique au compartiment périphérique.²³⁶ Ce modèle a été appliqué avec succès pour comparer les paramètres PK-PD (EC_{50} , k_{e0}) du mivacurium chez les personnes jeunes et âgées.²³⁷

L'objectif de notre étude n'était pas de caractériser la relation concentration-effet du mivacurium. Cependant, il aurait été intéressant de mener une étude PK-PD chez les mêmes patients après la rupture de l'état d'équilibre. Un échantillonnage artériel et veineux pendant la phase de redistribution aurait permis de dégager la contribution

du gradient artérioveineux sur l'estimation des paramètres PK-PD. Pour ce faire, on aurait pu inclure dans le modèle pharmacocinétique un compartiment périphérique veineux à partir duquel le mivacurium aurait été éliminé indépendamment de la clairance du compartiment central. Le compartiment effet conventionnel aurait été lié au compartiment central.²³⁸

Il aurait été intéressant aussi de mesurer quantitativement la concentration interstitielle du mivacurium dans le muscle (site d'action) à l'état d'équilibre par la technique de microdialyse. Cette technique aurait permis d'avoir une évidence expérimentale pour appuyer le choix du site du prélèvement sanguin (artériel ou veineux) pour les études PK-PD ultérieures. Étant donné les contraintes que peut présenter la technique de microdialyse, et la difficulté de recrutement des patients dans cette étude, nous avons préféré continuer ces expérimentations chez l'animal.

4.2 Détermination des concentrations interstitielles du rocuronium par microdialyse chez le chien anesthésié

Pour une éventuelle application de la microdialyse aux médicaments dont l'élimination est indépendante des organes (hydrolyse enzymatique ou dégradation d'Hoffmann), nous avons vérifié la validité de cette technique en utilisant un BNM dont l'élimination dépend uniquement des organes d'élimination associés au compartiment central (contrôle négatif). Nous avons opté pour le rocuronium étant donné que ce BNM est éliminé par excrétion biliaire et rénale.⁷² La validation de la technique de microdialyse a été réalisée chez le chien anesthésié durant une perfusion continue de rocuronium. Ainsi, nous avons pu démontrer qu'à l'état d'équilibre, les concentrations libres de rocuronium étaient similaires dans le liquide interstitiel et dans le sang veineux.

L'élément crucial dans la validation d'une méthode de microdialyse demeure le choix de la technique de calibration de la sonde de microdialyse. Plusieurs techniques ont été décrites dans la littérature.^{173,176} En considérant les avantages et les inconvénients de chacune, nous avons opté pour la technique dite de rétrodialyse. Cette technique a été bien décrite dans le deuxième manuscrit de cette thèse.

Dans cette étude, nous avons choisi le vécuronium comme étalon interne parce que ses caractéristiques physicochimiques et sa cinétique de diffusion lors de la dialyse *in vitro* étaient similaires à celles du rocuronium.

Lors d'une première série d'expériences chez le chien anesthésié, les résultats de la rétrodialyse étaient très surprenants. À l'état d'équilibre, les concentrations de rocuronium obtenues dans le liquide interstitiel représentaient approximativement 47% des concentrations veineuses libres. Un tel gradient ne peut s'expliquer que lorsqu'il y a séquestration ou conversion métabolique au niveau du tissu. Or, de par la nature chimique du rocuronium, ces mécanismes sont peu probables. La profondeur de l'anesthésie peut affecter le débit sanguin et la perfusion capillaire locale,²³⁹ qui influencent à leur tour la diffusion du rocuronium dans le liquide interstitiel pouvant ainsi expliquer le gradient de concentration observé.

L'extraction du vécuronium à travers la sonde de microdialyse étant représentative de celle du rocuronium durant la période expérimentale, une différence des propriétés de diffusion de ces molécules *in vivo* pourrait expliquer le gradient de concentration observé entre le liquide interstitiel et le plasma à l'état d'équilibre. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons introduit une période de référence à la technique de rétrodialyse permettant de comparer les propriétés de diffusion du rocuronium et du vécuronium à travers la sonde de microdialyse *in vivo*.

Il est intéressant de constater que l'introduction de cette période de référence a révélé, chez certains chiens, que les propriétés de dialyse du rocuronium et du vécuronium pouvaient être affectés différemment *in vivo*. Parmi les facteurs pouvant causer un changement dans la perméabilité de la membrane de microdialyse *in vivo*, citons, une obstruction physique ou des fluctuations dans le débit sanguin local.

En démontrant que des molécules chimiquement semblables peuvent avoir des propriétés de transfert différentes à travers la sonde de microdialyse, il est impératif d'évaluer leur propriétés de dialyse *in vivo* avant toute application. En appliquant la méthode de calibration par rétrodialyse combinée au rocuronium, nous avons démontré que les concentrations interstitielles de rocuronium représentent 100 % des concentrations veineuses libres à l'équilibre. Brièvement, en utilisant la méthode de calibration par rétrodialyse combinée, on établi un rapport entre l'extraction du

rocuronium et celle du vécuronium à travers la sonde de microdialyse, avant l'administration systémique du rocuronium. Ce rapport permet de corriger pour l'extraction du rocuronium durant la période expérimentale.

Après une analyse approfondie des résultats, nous en sommes venus à la conclusion que l'extraction du vécuronium à travers la sonde de microdialyse pouvait varier en fonction du temps. Ceci pourrait être expliqué par un ralentissement de la microcirculation régionale ou encore par un changement de la perméabilité capillaire au cours du temps. Lorsqu'on utilise la technique de rétrodialyse par le médicament lui-même, on assume que les propriétés de dialyse demeurent les mêmes durant l'expérience. Cependant, les changements d'ordre physiologique et/ou pharmacologique mentionnés doivent être pris en considération.

Le point saillant de cette étude est que nous ayons pu quantifier d'une manière exacte et précise, les concentrations libres de rocuronium dans la biophase (muscle).

4.3 Concentrations du rocuronium dans le liquide interstitiel chez le chien à l'état d'équilibre: Valeurs expérimentales versus valeurs prédites

En modélisation PK-PD, la concentration du médicament dans le compartiment effet est dérivée à partir des concentrations plasmatiques mesurées. Par conséquent, le temps requis pour atteindre l'équilibre entre le compartiment plasmatique et le compartiment effet pourrait dépendre du lien choisi pour le modèle mathématique. Dans le cas de BNMs, la quantification des concentrations dans le muscle présenterait un avantage majeur puisqu'elle nous permettrait de vérifier la validité des modèles mathématiques dans la prédiction des concentrations dans le compartiment effet.

L'objectif de ce travail était de vérifier la validité des modèles mathématiques dans la prédiction des concentrations des BNMs dans la biophase. Pour ce faire, nous avons procédé à la comparaison des concentrations interstitielles mesurées dans le muscle par microdialyse avec les concentrations effet et périphériques dérivées mathématiquement.

Nous avons démontré chez le chien anesthésié, qu'à l'état d'équilibre, les concentrations interstitielles dans le muscle sont équivalentes aux concentrations prédites pour le compartiment effet par le modèle PK-PD et ce, même pendant des périodes prolongées de paralysie. Ceci prouve que l'approche mathématique est un outil valable pour la prédiction de la concentration-effet responsable de l'effet pharmacologique.

En mesurant les concentrations interstitielles durant les premières 40 min suivant le début de perfusion de rocuronium, nous avons démontré que ces concentrations étaient très similaires aux concentrations plasmatiques. D'un point de vue pharmacocinétique, ceci est une évidence d'un transfert transcapillaire instantané de la fraction libre du rocuronium. Du point de vue physiologique, le rocuronium est une molécule chargée qui doit emprunter les espaces interendothéliaux pour gagner le liquide interstitiel. Dans ce cas, sa vitesse de transfert dépendrait du débit sanguin régional. Un transfert rapide a été également observé pour la gallamine²⁰⁹ et certains antibiotiques^{240,241} après administration d'un bolus intraveineux. Ainsi, pour les molécules hydrophiles inférieures à 2000 D, il est logique de proposer que le liquide interstitiel pourrait appartenir au même compartiment pharmacocinétique que le plasma.

En déterminant les concentrations musculaires totales du rocuronium au temps du sacrifice (estimé approximativement à 250 min), nous avons révélé une accumulation importante de rocuronium dans le muscle. Cette accumulation ne peut être expliquée par une diffusion intracellulaire parce que le gradient artérioveineux à l'équilibre était de 6% d'une part, et d'autre part, parce que la perméabilité cellulaire du rocuronium est faible. De plus, en considérant qu'au moment du sacrifice le chien a récupéré sa fonction neuromusculaire, il est exclu que le rocuronium soit lié aux récepteurs cholinergiques. Par conséquent, cette accumulation ne peut être expliquée que par une liaison non spécifique aux protéines tissulaires.

Dans le domaine de l'anesthésie, on a pu attribué la longue durée d'action de certains bloqueurs neuromusculaires à une captation et une accumulation hépatiques. Ce phénomène est d'autant plus accentué lorsque la molécule renferme dans sa structure un noyau stéroïdien qui augmente sa lipophilicité. Ce phénomène d'accumulation hépatique a été décrit pour le vécuronium.²⁴²

Nos résultats révèlent pour la première fois que le muscle, le site d'action des BNM, pourrait être un organe d'accumulation. Cette propriété est probablement inhérente au noyau stéroïdien présent dans la molécule de rocuronium. Cette suggestion est attribuée au fait que la digoxine, renfermant un noyau stéroïdien dans sa structure, s'accumule également dans le muscle cardiaque.²⁴³ Les résultats de ces recherches suscitent un questionnement en ce qui concerne le mécanisme de captation musculaire. S'agissant d'un ammonium quaternaire, le rocuronium emprunte les transporteurs cationiques au niveau du foie pour traverser rapidement l'hépatocyte avant d'être excrété dans les canalicules biliaires.²⁴⁴ Cependant, la présence de tels transporteurs n'a jamais été identifiée dans le muscle. Afin d'élucider le mécanisme d'accumulation musculaire, il serait intéressant d'investiguer la présence d'éventuels transporteurs cationiques.

4.4 Détermination des concentrations interstitielles du mivacurium par microdialyse chez le chien anesthésié

Outre leur hydrolyse par la cholinestérase plasmatique, nous avons démontré que les isomères actifs du mivacurium étaient éliminés au niveau du muscle. En effet, un gradient artérioveineux d'environ 40 % a été mesuré à l'état d'équilibre chez le patient anesthésié.²⁴⁵ L'objectif de cette dernière étude était de quantifier l'extraction musculaire du mivacurium en mesurant ses concentrations interstitielles par microdialyse. Nous avons choisi le chien comme modèle animal dans cette étude pour deux raisons: la première étant que l'activité de la cholinestérase plasmatique a été rapportée comme élevée par rapport aux autres espèces animales,²⁴⁶ la deuxième étant la courte demi-vie des isomères actifs du mivacurium (estimée à 4 min) chez le chien.²⁴⁷

Après administration du mivacurium chez le chien anesthésié, nous avons remarqué que, contrairement à ce qu'on avait observé chez le patient, les isomères actifs n'étaient pas éliminés rapidement de la circulation sanguine. En effet, nous avons estimé la demi-vie d'élimination du mivacurium *cis trans* et *trans trans* à approximativement 60 min.

L'absence des métabolites monoester et alcool dans les échantillons plasmatiques était surprenante. Ces métabolites étant issus de la dégradation enzymatique stéréosélective du mivacurium,¹⁰¹ nous avons suggéré que cette enzyme ne serait pas responsable de la dégradation du mivacurium chez le chien et que les voies d'élimination du mivacurium seraient rénales et/ou biliaires.

Il est fort probable que l'affinité de la cholinestérase pour le mivacurium chez le chien soit plus faible que chez l'homme, expliquant ainsi une plus grande stabilité dans le plasma. D'ailleurs, il est logique de croire qu'il existe des différences dans la nature et les taux de la cholinestérase plasmatique entre les espèces animales.¹¹⁹

Étant donné le comportement pharmacocinétique inattendu du mivacurium chez le chien, nous avons d'abord cru que la cinétique du mivacurium n'était pas linéaire. Nous avons essayé plusieurs doses et plusieurs régimes de perfusion pour exclure toute possibilité de saturation de la cholinestérase plasmatique. Par conséquent, nous n'avons pas été capables de mesurer un gradient artérioveineux à l'état d'équilibre. L'équilibre n'étant pas atteint (demi-vie longue), il était très difficile de conclure en ce qui concerne les concentrations interstitielles du mivacurium mesurées dans les échantillons de microdialyse. Cette étude démontre que le mivacurium ne subit pas d'hydrolyse musculaire chez le chien. Par conséquent, la mesure quantitative de l'extraction musculaire, démontrée au préalable chez le patient anesthésié, n'a pas été réalisée.

Par contre, nous avons pu caractériser la relation concentration-effet du mivacurium, qui selon nos connaissances, n'a jamais été réalisée chez l'animal. Une seule étude PK-PD a été rapportée chez le rat, mais en quantifiant le mivacurium racémique par une méthode non stéréosélective.²⁴⁹

Du point de vue pharmacodynamique, la durée d'action du mivacurium chez le chien se trouve très prolongée par rapport à celle observée chez l'homme. En effet, la demi-vie biologique du mivacurium estimée chez le chien est 3 fois plus longue que sa demi-vie pharmacologique estimée par l'index de récupération. En d'autres mots, le temps de récupération du bloc neuromusculaire induit par le mivacurium est régi par le phénomène de redistribution dans les tissus et non par l'élimination.

Du point de vue modélisation PK-PD, un lien central classique a été utilisé pour relier les concentrations plasmatiques du mivacurium à l'effet pharmacologique. En effet, comme la demi-vie d'élimination n'est pas plus rapide que la vitesse de transfert dans le compartiment effet, un lien périphérique n'est pas nécessaire,²³⁶ contrairement à ce qu'on observe chez l'homme. Dans notre étude, le chien démontre un début d'action rapide, comparable à celui déterminé chez l'homme. Ceci est dû au fait que le début d'action d'un BNM est régi par ses propriétés physicochimiques (coefficient de partage, polarité..) ²⁵⁰ qui dictent ses propriétés de diffusion vers le site effecteur. La concentration efficace à 50% de l'effet (EC₅₀) est moins élevée chez le chien indiquant que celui-ci est plus sensible au mivacurium comparativement à l'homme. Selon nos études animales, il appert que le chien soit plus sensible que l'homme au mivacurium et au rocuronium.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que, pour un médicament distribué dans le liquide extracellulaire de l'organisme tel que le rocuronium, le liquide interstitiel appartient au même compartiment pharmacocinétique que le plasma pendant la phase d'installation de l'effet pharmacologique. Pour les BNMs dont l'élimination est indépendante des organes, et pour lesquels une élimination périphérique a été démontrée (mivacurium) ou tout à fait probable (succinylcholine), on présume que les concentrations interstitielles musculaires évolueraient en parallèle avec les concentrations plasmatiques. Au début de la perfusion, elles seraient probablement inférieures aux concentrations artérielles, à cause de l'extraction tissulaire, pour ensuite devenir supérieures, après la rupture de l'état d'équilibre, la vitesse de redistribution étant plus rapide que la vitesse d'élimination dans le muscle. Évidemment, seules des études chez d'autres espèces animales pourront confirmer ou infirmer ces prédictions. L'absence d'extraction musculaire pour le mivacurium chez le chien en dépit d'une activité normale de la cholinestérase plasmatique souligne l'importance d'effectuer des études *in vivo*. Nos résultats indiquent que la butyrylcholine n'est pas un substrat adéquat pour représenter la vitesse d'hydrolyse plasmatique du mivacurium *in vitro* mais également *in vivo*. Ce constat remet en question la valeur prédictive des extrapolations *in vitro* - *in vivo*, et ce, pour une même espèce.

5 Perspectives d'avenir

La particularité majeure du mivacurium est que ce BNM est éliminé au niveau de son site d'action, le muscle. Étant donné l'importance de cette élimination tissulaire, l'évaluation quantitative des concentrations interstitielles du mivacurium serait cruciale pour guider le choix du site de prélèvement, artériel ou veineux lors des études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques. En effet, nous avons démontré que le sang artériel serait préférable pour l'estimation des paramètres pharmacocinétiques qui, à leur tour, déterminent le choix de la vitesse de perfusion en milieu de pratique anesthésique. Cependant, lorsqu'il s'agit de caractériser la relation concentration-effet du mivacurium, le choix du site de prélèvement idéal est plus controversé puisque le muscle devient un organe d'élimination. Advenant que les concentrations en contact direct avec les récepteurs (concentrations interstitielles) ne représentent qu'une fraction des concentrations artérielles, ne serait-il pas plus réaliste d'utiliser les concentrations veineuses pour dériver les concentrations dans le compartiment effet lorsqu'on fait un lien PK-PD pour le mivacurium?

En mesurant les concentrations interstitielles du mivacurium par microdialyse chez le lapin, et en les comparant aux concentrations plasmatiques artérielles et veineuses, on saurait probablement répondre à cette question. En effet, le lapin serait un modèle animal idéal puisqu'une variante génétique a résulté en une activité élevée de la cholinestérase plasmatique.²⁵¹

La détermination des concentrations interstitielles du mivacurium pourrait permettre d'estimer la vitesse d'élimination dans le compartiment périphérique (K_{20}) rendant ainsi identifiable le modèle compartimental avec élimination périphérique. Récemment, un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK) a été proposé pour estimer les concentrations artérielles à partir des concentrations veineuses mesurées.²⁵² Cette approche pourrait être envisageable pour un médicament éliminé dans son site d'action tel que le mivacurium.

6 Références

1. Smith P. *The arrows of Mercy*. New York: Doubleday, 1969.
2. Bernard C. Analyse physiologique des propriétés des systèmes musculaires et nerveux au moyen du curare. *C.R Academic Science* 43, 825-829. 1856.
3. Griffith HR, Johnson GE. The use of curare in general anesthesia. *Anesthesiology* 1942; 3:418-420.
4. Bovet D, Depierre F, Courvoisier S, Lestrangé Y. Recherches sur les poisons curarisants de synthèse: éthers phénoliques à fonctions ammonium quaternaires. Action du tri-iodo-éthylate de tri(diéthylaminoéthoxy) benzène (2559F). *Arch Int Pharmacodyn* 1949; 80:172-188.
5. Hewlett AM, Hulands GH, Nunn JF, Milledge JS. Functional Residual Capacity During Anaesthesia III. Artificial Ventilation. *Br J Anaesth* 46, 495-503. 1974.
6. Bowman WC. Physiology and pharmacology of neuromuscular transmission, with special reference to the possible consequences of prolonged blockade. *Intensive Care Med* 1993; 19 Suppl 2:S45-S53.
7. Parsons SM, Bahr BA, Gracz LM, Kaufman R, Kornreich WD, Nilsson L et al. Acetylcholine transport: fundamental properties and effects of pharmacologic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 493:220-233.
8. Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P. Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol* 1991; 436:257-282.
9. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995; 375(6533):645-653.

10. Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* 1988; 11(10):458-464.
11. Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE et al. The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 1994; 369(6480):493-497.
12. Bowman WC. Recent Discoveries in Neuromuscular Transmission. In: Adams AP, Cashman JN, editors. *Recent Advances in Anaesthesia and Analgesia*. London: 1998:21-42.
13. Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S et al. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1986; 321(6068):406-411.
14. Lee C. Structure, conformation, and action of neuromuscular blocking drugs. *Br J Anaesth* 2001; 87(5):755-769.
15. Pedersen SE, Cohen JB. d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(7):2785-2789.
16. Devillers-Thierry A, Giraudat J, Bentaboulet M, Changeux JP. Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(7):2067-2071.
17. Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y et al. Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 1983; 302(5908):528-532.
18. Takai T, Noda M, Mishina M, Shimizu S, Furutani Y, Kayano T et al. Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 1985; 315(6022):761-764.

19. Abramson SN, Trischman JA, Tapiolas DM, Harold EE, Fenical W, Taylor P. Structure/activity and molecular modeling studies of the lophotoxin family of irreversible nicotinic receptor antagonists. *J Med Chem* 1991; 34(6):1798-1804.
20. Sine SM. Identification of equivalent residues in the gamma, delta, and epsilon subunits of the nicotinic receptor that contribute to alpha-bungarotoxin binding. *J Biol Chem* 1997; 272(38):23521-23527.
21. Trautmann A. Curare can open and block ionic channels associated with cholinergic receptors. *Nature* 1982; 298(5871):272-275.
22. Villarroel A, Sakmann B. Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *J Physiol* 1996; 496(Pt 2):331-338.
23. Jackson MB, Imoto K, Mishina M, Konno T, Numa S, Sakmann B. Spontaneous and agonist-induced openings of an acetylcholine receptor channel composed of bovine muscle alpha-, beta- and delta-subunits. *Pflugers Arch* 1990; 417(2):129-135.
24. Sine SM, Claudio T, Sigworth FJ. Activation of Torpedo acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts. Single channel current kinetics reveal distinct agonist binding affinities. *J Gen Physiol* 1990; 96(2):395-437.
25. Grosman C, Zhou M, Auerbach A. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 2000; 403(6771):773-776.
26. Grosman C, Salamone FN, Sine SM, Auerbach A. The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. *J Gen Physiol* 2000; 116(3):327-340.
27. Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1975; 43:103-218.
28. Bowman WC, Prior C, Marshall IG. Presynaptic receptors in the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 604:69-81.

29. Prior C, Tian L, Dempster J, Marshall IG. Prejunctional actions of muscle relaxants: synaptic vesicles and transmitter mobilization as sites of action. *Gen Pharmacol* 1995; 26(4):659-666.
30. Ali HH, Utting JE, Gray C. Stimulus frequency in the detection of neuromuscular block in humans. *Br J Anaesth* 1970; 42(11):967-978.
31. Ali HH, Utting JE, Gray TC. Quantitative assessment of residual antidepolarizing block. II. *Br J Anaesth* 1971; 43(5):478-485.
32. Lee CM. Train-of-4 quantitation of competitive neuromuscular block. *Anesth Analg* 1975; 54(5):649-653.
33. Ali HH, Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. *Anesthesiology* 1976; 45(2):216-249.
34. Gissen AJ, Katz RL. Twitch, tetanus and posttetanic potentiation as indices of nerve-muscle block in man. *Anesthesiology* 1969; 30(5):481-487.
35. Feldman SA, Tyrrell MF. A new theory of the termination of action of the muscle relaxants. *Proc R Soc Med* 1970; 63(7):692-695.
36. Smith CE, Donati F, Bevan DR. Potency of succinylcholine at the diaphragm and at the adductor pollicis muscle. *Anesth Analg* 1988; 67(7):625-630.
37. Donati F, Antzaka C, Bevan DR. Potency of pancuronium at the diaphragm and the adductor pollicis muscle in humans. *Anesthesiology* 1986; 65(1):1-5.
38. Pansard JL, Chauvin M, Lebrault C, Gauneau P, Duvaldestin P. Effect of an intubating dose of succinylcholine and atracurium on the diaphragm and the adductor pollicis muscle in humans. *Anesthesiology* 1987; 67(3):326-330.
39. Donati F, Meistelman C, Plaud B. Vecuronium neuromuscular blockade at the diaphragm, orbicularis oculi and adductor pollicis muscles. *Can J Anaesth* 1990; 37(4 Pt 2):S13.

40. Donati F, Meistelman C, Plaud B. Vecuronium neuromuscular blockade at the adductor muscles of the larynx and adductor pollicis. *Anesthesiology* 1991; 74(5):833-837.
41. Smith CE, Donati F, Bevan DR. Differential effects of pancuronium on masseter and adductor pollicis muscles in humans. *Anesthesiology* 1989; 71(1):57-61.
42. Isono S, Ide T, Kochi T, Mizuguchi T, Nishino T. Effects of partial paralysis on the swallowing reflex in conscious humans. *Anesthesiology* 1991; 75(6):980-984.
43. Pavlin EG, Holle RH, Schoene RB. Recovery of airway protection compared with ventilation in humans after paralysis with curare. *Anesthesiology* 1989; 70(3):381-385.
44. Bovet D. Some aspects of the relationship between chemical constitution and curare-like activity. *Ann N Y Acad Sci* 1951; 54:107.
45. Mellinghoff H, Diefenbach C, Bischoff A, Grond S, Buzello W. Dose-response relationship of rocuronium bromide during intravenous anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1994; 9:20-24.
46. Schiere S, Proost JH, Schuringa M, Wierda JM. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-dynamic relationship between rapacuronium (Org 9487) and its 3-desacetyl metabolite (Org 9488). *Anesth Analg* 1999; 88(3):640-647.
47. Wierda JM, Proost JH. Structure-pharmacodynamic-pharmacokinetic relationships of steroidal neuromuscular blocking agents. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1995; 11:45-54.
48. Savarese JJ, Miller RD, Lien CA, Caldwell JE. Pharmacologie des myorelaxants et leurs antagonistes. In: Miller RD, editor. *Anesthésie*. 1996:417-487.

49. Bowman WC, Rodger IW, Houston J, Marshall RJ, McIndewar I. Structure:action relationships among some desacetoxy analogues of pancuronium and vecuronium in the anesthetized cat. *Anesthesiology* 1988; 69(1):57-62.
50. Basta SJ. Clinical pharmacology of mivacurium chloride: a review. *J Clin Anesth* 1992; 4(2):153-163.
51. Basta SJ, Savarese JJ, Ali HH, Embree PB, Schwartz AF, Rudd GD et al. Clinical pharmacology of doxacurium chloride. A new long-acting nondepolarizing muscle relaxant. *Anesthesiology* 1988; 69(4):478-486.
52. Boros EE, Bigham EC, Boswell GE, Mook RA, Jr., Patel SS, Savarese JJ et al. Bis- and mixed-tetrahydroisoquinolinium chlorofumarates: new ultra-short-acting nondepolarizing neuromuscular blockers. *J Med Chem* 1999; 42(2):206-209.
53. Fisher DM, Canfell PC, Fahey MR, Rosen JI, Rupp SM, Sheiner LB et al. Elimination of atracurium in humans: contribution of Hofmann elimination and ester hydrolysis versus organ-based elimination. *Anesthesiology* 1986; 65(1):6-12.
54. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of mivacurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 1994; 80(6):1296-1302.
55. Fisher DM, Reynolds KS, Schmith VD, Hsu J, Sokoll MD, Lennon RL et al. The influence of renal function on the pharmacokinetics and pharmacodynamics and simulated time course of doxacurium. *Anesth Analg* 1999; 89(3):786-795.
56. Kienlen J. [The neuromuscular junction and mechanism of action of curariform drugs] Jonction neuromusculaire et mécanisme d'action des curares. *Ann Fr Anesth Reanim* 1984; 3(2):116-128.
57. Taylor P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: Goodman Gilman A, Rall TW, NAs, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's The*

pharmacological Basis of Therapeutics, 8 edn. New York: Pergamon Press, 1990:166-186.

58. Zaimis E. The neuromuscular junction: area of uncertainty. In: Zaimis E, editor. *Neuromuscular junction*. Berlin: 1976:1-18.
59. Standaert FG. Physiologie et pharmacologie neuromusculaires. In: Miller RD, editor. *Anesthésie*. 1996:731-754.
60. Aglan MY, Pollard BJ. Molecular mechanisms of neuromuscular blocking agents: is the increased understanding of importance to the practising anaesthetist? *Pharmacol Ther* 1995; 68(3):365-383.
61. Alvarez-Gomez JA, Estelles ME, Fabregat J, Perez F, Brugger AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium bromide in adult patients. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1994; 9:53-56.
62. Wierda JM, Hommes FD, Nap HJ, van den BL. Time course of action and intubating conditions following vecuronium, rocuronium and mivacurium. *Anaesthesia* 1995; 50(5):393-396.
63. Booth MG, Marsh B, Bryden FM, Robertson EN, Baird WL. A comparison of the pharmacodynamics of rocuronium and vecuronium during halothane anaesthesia. *Anaesthesia* 1992; 47(10):832-834.
64. Wierda JM, Kleef UW, Lambalk LM, Kloppenburg WD, Agoston S. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of Org 9426, a new non-depolarizing neuromuscular blocking agent, in patients anaesthetized with nitrous oxide, halothane and fentanyl. *Can J Anaesth* 1991; 38(4 Pt 1):430-435.
65. Atherton DP, Hunter JM. Clinical pharmacokinetics of the newer neuromuscular blocking drugs. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(3):169-189.
66. Cooper RA, Maddineni VR, Mirakhur RK, Wierda JM, Brady M, Fitzpatrick KT. Time course of neuromuscular effects and pharmacokinetics of rocuronium bromide

(Org 9426) during isoflurane anaesthesia in patients with and without renal failure. *Br J Anaesth* 1993; 71(2):222-226.

67. van den BL, Wierda JM, Smeulers NJ, van Santen GJ, Leclercq MG, Hennis PJ. Clinical pharmacology of rocuronium (Org 9426): study of the time course of action, dose requirement, reversibility, and pharmacokinetics. *J Clin Anesth* 1994; 6(4):288-296.

68. Larijani GE, Gratz I, Afshar M, McDonald PA, Fisher DM. The effect of isoflurane versus balanced anesthesia on rocuronium's pharmacokinetics and infusion requirement. *Pharmacotherapy* 1995; 15(1):36-41.

69. Dragne A, Varin F, Plaud B, Donati F. Rocuronium pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship under stable propofol or isoflurane anesthesia. *Can J Anaesth* 2002; 49(4):353-360.

70. McCoy EP, Mirakhur RK, Maddineni VR, Wierda JM, Proost JH. Pharmacokinetics of rocuronium after bolus and continuous infusion during halothane anaesthesia. *Br J Anaesth* 1996; 76(1):29-33.

71. Khuenl-Brady K, Castagnoli KP, Canfell PC, Caldwell JE, Agoston S, Miller RD. The neuromuscular blocking effects and pharmacokinetics of ORG 9426 and ORG 9616 in the cat. *Anesthesiology* 1990; 72(4):669-674.

72. Proost JH, Eriksson LI, Mirakhur RK, Roest G, Wierda JM. Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans. *Br J Anaesth* 2000; 85(5):717-723.

73. van Miert MM, Eastwood NB, Boyd AH, Parker CJ, Hunter JM. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in patients with hepatic cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44(2):139-144.

74. Muir AW, Houston J, Green KL, Marshall RJ, Bowman WC, Marshall IG. Effects of a new neuromuscular blocking agent (Org 9426) in anaesthetized cats and pigs and in isolated nerve-muscle preparations. *Br J Anaesth* 1989; 63(4):400-410.

75. Magorian T, Wood P, Caldwell J, Fisher D, Segredo V, Szenohradzky J et al. The pharmacokinetics and neuromuscular effects of rocuronium bromide in patients with liver disease. *Anesth Analg* 1995; 80(4):754-759.
76. Servin FS, Lavaut E, Kleef U, Desmonts JM. Repeated doses of rocuronium bromide administered to cirrhotic and control patients receiving isoflurane. A clinical and pharmacokinetic study. *Anesthesiology* 1996; 84(5):1092-1100.
77. Khalil M, D'Honneur G, Duvaldestin P, Slavov V, De Hys C, Gomeni R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rocuronium in patients with cirrhosis. *Anesthesiology* 1994; 80(6):1241-1247.
78. Westra P, Keulemans GT, Houwertjes MC, Hardonk MJ, Meijer DK. Mechanisms underlying the prolonged duration of action of muscle relaxants caused by extrahepatic cholestasis. *Br J Anaesth* 1981; 53(3):217-227.
79. Huizinga AC, Vandenbrom RH, Wierda JM, Hommes FD, Hennis PJ. Intubating conditions and onset of neuromuscular block of rocuronium (Org 9426); a comparison with suxamethonium. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36(5):463-468.
80. Cooper R, Mirakhur RK, Clarke RS, Boules Z. Comparison of intubating conditions after administration of Org 9246 (rocuronium) and suxamethonium. *Br J Anaesth* 1992; 69(3):269-273.
81. Agoston S. Onset time and evaluation of intubating conditions: rocuronium in perspective. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1995; 11:31-37.
82. Prien T, Zahn P, Menges M, Brussel T. 1 x ED90 dose of rocuronium bromide: tracheal intubation conditions and time-course of action. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1995; 11:85-90.
83. Donati F. Onset of action of relaxants. *Can J Anaesth* 1988; 35(3 :(Pt 2):t-8.

84. Kopman AF, Klewicka MM, Kopman DJ, Neuman GG. Molar potency is predictive of the speed of onset of neuromuscular block for agents of intermediate, short, and ultrashort duration. *Anesthesiology* 1999; 90(2):425-431.
85. Cooper RA, Mirakhur RK, Wierda JM, Maddineni VR. Pharmacokinetics of rocuronium bromide in patients with and without renal failure. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1995; 11:43-44.
86. Davis L, Jayarajah MJ, Toner CC, Flynn PJ. Evaluation of neuromuscular effects and antagonism of rocuronium bromide: a preliminary report. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 1995; 11:65-68.
87. Ali HH, Savarese JJ. Stimulus frequency and dose-response curve to d-tubocurarine in man. *Anesthesiology* 1980; 52(1):36-39.
88. Cooper RA, Mirakhur RK, Elliott P, McCarthy GJ. Estimation of the potency of ORG 9426 using two different modes of nerve stimulation. *Can J Anaesth* 1992; 39(2):139-142.
89. Wierda JM, Proost JH. The pharmacokinetics and the pharmacokinetic-dynamic relationship of rocuronium bromide. *Anaesthetic pharmacol rev* 1995; 3:192-201.
90. Oris B, Crul JF, Vandermeersch E, Van Aken H, Van Egmond J, Sabbe MB. Muscle paralysis by rocuronium during halothane, enflurane, isoflurane, and total intravenous anesthesia. *Anesth Analg* 1993; 77(3):570-573.
91. Lambalk LM, de Wit AP, Wierda JM, Hennis PJ, Agoston S. Dose-response relationship and time course of action of Org 9426. A new muscle relaxant of intermediate duration evaluated under various anaesthetic techniques. *Anaesthesia* 1991; 46(11):907-911.
92. Lowry DW, Mirakhur RK, McCarthy GJ, Carroll MT, McCourt KC. Neuromuscular effects of rocuronium during sevoflurane, isoflurane, and intravenous anesthesia. *Anesth Analg* 1998; 87(4):936-940.

93. Frampton JE, McTavish D. Mivacurium. A review of its pharmacology and therapeutic potential in general anaesthesia. *Drugs* 1993; 45(6):1066-1089.
94. Basta SJ. Clinical pharmacology of mivacurium chloride: a review. *J Clin Anesth* 1992; 4(2):153-163.
95. Lacroix M, Donati F, Varin F. Pharmacokinetics of mivacurium isomers and their metabolites in healthy volunteers after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 1997; 86(2):322-330.
96. Cook DR, Stiller RL, Weakly JN, Chakravorti S, Brandom BW, Welch RM. In vitro metabolism of mivacurium chloride (BW B1090U) and succinylcholine. *Anesth Analg* 1989; 68(4):452-456.
97. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the three isomers of mivacurium in health, in end-stage renal failure and in patients with impaired renal function. *Br J Anaesth* 1995; 75(1):31-36.
98. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 1994; 73(5):613-618.
99. Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S et al. Pharmacokinetics of mivacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. *Br J Anaesth* 1992; 69(6):580-585.
100. Ostergaard D, Rasmussen SN, Viby-Mogensen J, Pedersen NA, Boysen R. The influence of drug-induced low plasma cholinesterase activity on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium. *Anesthesiology* 2000; 92(6):1581-1587.
101. Laurin J, Donati F, Varin F. Stereoselective in vitro degradation pattern of mivacurium in human plasma. *Br J Anaesth* 2002; 89(6):832-838.
102. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of mivacurium in

patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 1994; 80(6):1296-1302.

103. Diefenbach C, Mellinshoff H, Lynch J, Buzello W. Mivacurium: dose-response relationship and administration by repeated injection or infusion. *Anesth Analg* 1992; 74(3):420-423.

104. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RP, Sunder N et al. The clinical neuromuscular pharmacology of mivacurium chloride (BW B1090U). A short-acting nondepolarizing ester neuromuscular blocking drug. *Anesthesiology* 1988; 68(5):723-732.

105. Gramstad L, Lilleaasen P. Dose-response relation for atracurium, ORG NC 45 and pancuronium. *Br J Anaesth* 1982; 54(6):647-651.

106. Powers DM, Brandom BW, Cook DR, Byers R, Sarner JB, Simpson K et al. Mivacurium infusion during nitrous oxide-isoflurane anesthesia: a comparison with nitrous oxide-opioid anesthesia. *J Clin Anesth* 1992; 4(2):123-126.

107. Brandom BW, Woelfel SK, Cook DR, Weber S, Powers DM, Weakly JN. Comparison of mivacurium and suxamethonium administered by bolus and infusion. *Br J Anaesth* 1989; 62(5):488-493.

108. Devlin JC, Head-Rapson AG, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacodynamics of mivacurium chloride in the cirrhotic patient. *Br J Anaesth* 1992; 69:534-535P.

109. Ostergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J. Influence of plasma cholinesterase activity on recovery from mivacurium-induced neuromuscular blockade in phenotypically normal patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36(7):702-706.

110. Ostergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J. Mivacurium-induced neuromuscular blockade in patients with atypical plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37(3):314-318.

111. Goudsouzian NG, Denman W, Schwartz A, Shorten G, Foster V, Samara B. Pharmacodynamic and hemodynamic effects of mivacurium in infants anesthetized with halothane and nitrous oxide. *Anesthesiology* 1993; 79(5):919-925.
112. Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia* 1980; 35(2):174-197.
113. Williams FM. Clinical significance of esterases in man. *Clin Pharmacokinet* 1985; 10(5):392-403.
114. Liddel J, Newman GE, Brown DF. A pseudocholinesterase variant in human tissues. *Nature* 1963; 198:1090-1091.
115. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 1987; 262(2):549-557.
116. Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Can J Med Sci* 1957; 35(6):339-346.
117. Pantuck EJ. Plasma cholinesterase: gene and variations. *Anesth Analg* 1993; 77(2):380-386.
118. Meyers DK. Studies on cholinesterase. 9. Species variation in the specificity pattern of the pseudo cholinesterases. *Biochem J* 1953; 55(1):67-79.
119. Tecles F, Ceron JJ. Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. *Res Vet Sci* 2001; 70(3):233-238.
120. Keller P. Enzyme activities in the dog: tissue analyses, plasma values, and intracellular distribution. *Am J Vet Res* 1981; 42(4):575-582.
121. Kiechel JR, Steimer JL, Frydman A. La modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique. *Colloque INSERM* 1987; 156:91-118.

122. Holford NH, Sheiner LB. Kinetics of pharmacologic response. *Pharmacol Ther* 1982; 16(2):143-166.
123. Riegelman S, Loo JC, Rowland M. Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment. *J Pharm Sci* 1968; 57(1):117-123.
124. Fisher DM. (Almost) everything you learned about pharmacokinetics was (somewhat) wrong! *Anesth Analg* 1996; 83(5):901-903.
125. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 1994; 73(5):613-618.
126. Stiller RL, Cook DR, Chakravorti S. In vitro degradation of atracurium in human plasma. *Br J Anaesth* 1985; 57(11):1085-1088.
127. Kisor DF, Schmith VD, Wargin WA, Lien CA, Ornstein E, Cook DR. Importance of the organ-independent elimination of cisatracurium. *Anesth Analg* 1996; 83(5):1065-1071.
128. Ward S, Neill EA. Pharmacokinetics of atracurium in acute hepatic failure (with acute renal failure). *Br J Anaesth* 1983; 55(12):1169-1172.
129. Benet LZ. General treatment of linear mammillary models with elimination from any compartment as used in pharmacokinetics. *J Pharm Sci* 1972; 61(4):536-541.
130. Jacquez J. *Compartmental analysis in biology and medicine*, 3rd ed. BioMedware, 1996.
131. Welch RM, Brown A, Ravitch J, Dahl R. The in vitro degradation of cisatracurium, the R, cis-R'-isomer of atracurium, in human and rat plasma. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58(2):132-142.

132. Roy JJ, Donati F, Boismenu D, Varin F. Concentration-effect relation of succinylcholine chloride during propofol anesthesia. *Anesthesiology* 2002; 97(5):1082-1092.
133. Bergeron L, Bevan DR, Berrill A, Kahwaji R, Varin F. Concentration-effect relationship of cisatracurium at three different dose levels in the anesthetized patient. *Anesthesiology* 2001; 95(2):314-323.
134. Lien CA, Schmith VD, Belmont MR, Abalos A, Kisor DF, Savarese JJ. Pharmacokinetics of cisatracurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 1996; 84(2):300-308.
135. Sorooshian SS, Stafford MA, Eastwood NB, Boyd AH, Hull CJ, Wright PM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in young and elderly adult patients. *Anesthesiology* 1996; 84(5):1083-1091.
136. Schmith VD, Fiedler-Kelly J, Phillips L, Grasela TH, Jr. Dose proportionality of cisatracurium. *J Clin Pharmacol* 1997; 37(7):625-629.
137. Smith CE, van Miert MM, Parker CJ, Hunter JM. A comparison of the infusion pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium, the 1R-cis 1'R-cis isomer of atracurium, with atracurium besylate in healthy patients. *Anaesthesia* 1997; 52(9):833-841.
138. Hull CJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the benzylisoquinolinium muscle relaxants. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1995; 106:13-17.
139. Nakashima E, Benet LZ. General treatment of mean residence time, clearance, and volume parameters in linear mammillary models with elimination from any compartment. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1988; 16(5):475-492.
140. Tran TV, Fiset P, Varin F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium after a short infusion in patients under propofol anesthesia. *Anesth Analg* 1998; 87(5):1158-1163.

141. Laurin J, Nekka F, Donati F, Varin F. Assuming peripheral elimination: its impact on the estimation of pharmacokinetic parameters of muscle relaxants. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; 27(5):491-512.
142. Hennis PJ, Stanski DR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic factors that govern the clinical use of muscle relaxants. *Seminars in Anaesthesia* 1985; 4:21-30.
143. Fuseau E, Sheiner LB. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with a nonparametric pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther* 1984; 35(6):733-741.
144. Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 25(3):358-371.
145. Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 1981; 6(6):429-453.
146. Unadkat JD, Bartha F, Sheiner LB. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with nonparametric kinetic and dynamic models. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 40(1):86-93.
147. Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol* 1951; 167(1):13-46.
148. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N. Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl* 1979; 463:11-32.
149. Levick, J.R. The microcirculation and solute exchange. In: Koaster J, Ueberberg A, editors. *An introduction to cardiovascular physiology*, fourth edn. London: Arnold, 2003:149-169.

150. Myrhage R. Microvascular supply of skeletal muscle fibres. A microangiographic, histochemical and intravital microscopic study of hind limb muscles in the rat, rabbit and cat. *Acta Orthop Scand Suppl* 1977; 168:1-46.
151. Smaje L, Zweifach BW, Intaglietta M. Micropressures and capillary filtration coefficients in single vessels of the cremaster muscle of the rat. *Microvasc Res* 1970; 2(1):96-110.
152. Pyley MJ, Groom AC. Geometrical distribution of capillaries in mammalian striated muscle. *Am J Physiol* 1975; 228(5):1376-1383.
153. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol* 1959; 196(2):381-390.
154. Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J Cell Biol* 1974; 60(1):128-152.
155. Johansson BR. Size and distribution of endothelial plasmalemmal vesicles in consecutive segments of the microvasculature in cat skeletal muscle. *Microvasc Res* 1979; 17(2):107-117.
156. Bundgaard M, Frokjaer-Jensen J, Crone C. Endothelial plasmalemmal vesicles as elements in a system of branching invaginations from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(12):6439-6442.
157. Bundgaard M, Frokjaer-Jensen J. Functional aspects of the ultrastructure of terminal blood vessels: a qualitative study on consecutive segments of the frog mesenteric microvasculature. *Microvasc Res* 1982; 23(1):1-30.
158. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 1975; 64(3):586-607.
159. Wissig SL. Identification of the small pore in muscle capillaries. *Acta Physiol Scand Suppl* 1979; 463:33-44.

160. Ley K, Arfors KE. Segmental differences of microvascular permeability for FITC-dextran measured in the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 1986; 31(1):84-99.
161. Michel CC, Levick JR. Variations in permeability along individually perfused capillaries of the frog mesentery. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1977; 62(1):1-10.
162. Aukland K, Nicolaysen G. Interstitial fluid volume: local regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1981; 61(3):556-643.
163. Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* 1978; 58(1):255-315.
164. Parker JC, Gilchrist S, Cartledge JT. Plasma-lymph exchange and interstitial distribution volumes of charged macromolecules in the lung. *J Appl Physiol* 1985; 59(4):1128-1136.
165. Gilchrist SA, Parker JC. Exclusion of charged macromolecules in the pulmonary interstitium. *Microvasc Res* 1985; 30(1):88-98.
166. Curry FE, Michel CC. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvasc Res* 1980; 20(1):96-99.
167. Van Bree JB, de Boer AG, Danhof M, Ginsel LA, Breimer DD. Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 247(3):1233-1239.
168. Fujita T, Iwasa J, Hansch C. A new substituent constant, δ , derived from partition coefficient. *J Am Chem Society* 1964; 86:5175-5180.
169. Renkin EM. Capillary and cellular permeability to some compounds related to antipyrine. *Am J Physiol* 1953; 173(1):125-130.

170. Levitt DG. PKQuest: capillary permeability limitation and plasma protein binding - application to human inulin, dicloxacillin and ceftriaxone pharmacokinetics. *BMC Clin Pharmacol* 2002; 2(1):7.
171. Ogasawara H, Uozumi T, Kiya K, Kurisu K, Mikami T, Hotta T et al. Analysis and distribution of etoposide in rat brain tumor model: intracarotid versus intracarotid with angiotensin II-induced hypertension. *Cancer Invest* 1993; 11(3):299-305.
172. Hansen DK, Davies MI, Lunte SM, Lunte CE. Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci* 1999; 88(1):14-27.
173. Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; 14(3):267-288.
174. Morrison PF, Bungay PM, Hsiao JK, Ball BA, Mefford IN, Dedrick RL. Quantitative microdialysis: analysis of transients and application to pharmacokinetics in brain. *J Neurochem* 1991; 57(1):103-119.
175. Olson RJ, Justice JB, Jr. Quantitative microdialysis under transient conditions. *Anal Chem* 1993; 65(8):1017-1022.
176. De Lange EC, de Boer AG, Breimer DD. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2000 Dec 15 ;45 (2 - 3):125 -48 45(2-3):125-148.
177. Johansen MJ, Newman RA, Madden T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy* 1997; 17(3):464-481.
178. Ungerstedt U. Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230(4):365-373.
179. Benveniste H, Huttemeier PC. Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol* 1990; 35(3):195-215.

180. Osborne PG, O'Connor WT, Ungerstedt U. Effect of varying the ionic concentration of a microdialysis perfusate on basal striatal dopamine levels in awake rats. *J Neurochem* 1991; 56(2):452-456.
181. Gill SS, Donati F, Bevan DR. Clinical evaluation of double-burst stimulation. Its relationship to train-of-four stimulation. *Anaesthesia* 1990; 45(7):543-548.
182. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43(5):1369-1374.
183. Imperato A, Di Chiara G. Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci* 1984; 4(4):966-977.
184. Westerink BH, De Vries JB. Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects. *J Neurochem* 1988; 51(3):683-687.
185. Timmerman W, Westerink BH. Importance of the calcium content infused during microdialysis for the effects induced by D2 agonists on the release of dopamine in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 1991; 131(1):93-96.
186. Wages SA, Church WH, Justice JB, Jr. Sampling considerations for on-line microbore liquid chromatography of brain dialysate. *Anal Chem* 1986; 58(8):1649-1656.
187. de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res* 1994; 666(1):1-8.

188. Lindefors N, Amberg G, Ungerstedt U. Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *J Pharmacol Methods* 1989; 22(3):141-156.
189. Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem* 1989; 52(6):1667-1679.
190. Wang Y, Wong SL, Sawchuk RJ. Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus. *Pharm Res* 1993; 10(10):1411-1419.
191. Palsmeier RK, Lunte CE. Microdialysis sampling in tumor and muscle: study of the disposition of 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-di-N-oxide (SR 4233). *Life Sci* 1994; 55(10):815-825.
192. Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B, Fredholm BB. Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci Lett* 1982; 29(2):111-115.
193. DeGuchi Y, Terasaki T, Yamada H, Tsuji A. An application of microdialysis to drug tissue distribution study: in vivo evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of beta-lactam antibiotics in interstitial fluids. *J Pharmacobiodyn* 1992; 15(2):79-89.
194. Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci* 1990; 46(2):105-119.
195. Parsons LH, Justice JB, Jr. Extracellular concentration and in vivo recovery of dopamine in the nucleus accumbens using microdialysis. *J Neurochem* 1992; 58(1):212-218.
196. Lonroth P. Microdialysis--a new and promising method in clinical medicine. *J Intern Med* 1991; 230(4):363-364.

197. Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U. A comparison between three methods for estimation of extracellular concentrations of exogenous and endogenous compounds by microdialysis. *J Pharmacol Methods* 1991; 25(1):41-52.
198. Lonroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* 1987; 253(2 Pt 1):E228-E231.
199. Stahle L, Arner P, Ungerstedt U. Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. *Life Sci* 1991; 49(24):1853-1858.
200. Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method. *Pharm Res* 1998; 15(11):1673-1679.
201. Wong SL, Van Belle K, Sawchuk RJ. Distributional transport kinetics of zidovudine between plasma and brain extracellular fluid/cerebrospinal fluid in the rabbit: investigation of the inhibitory effect of probenecid utilizing microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264(2):899-909.
202. Stahle L. Drug distribution studies with microdialysis: I. Tissue dependent difference in recovery between caffeine and theophylline. *Life Sci* 1991; 49(24):1835-1842.
203. Boschi G, Launay N, Rips R, Scherrmann JM. Brain microdialysis in the mouse. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33(1):29-33.
204. Evrard PA, Deridder G, Verbeeck RK. Intravenous microdialysis in the mouse and the rat: development and pharmacokinetic application of a new probe. *Pharm Res* 1996; 13(1):12-17.
205. Kovar A, Dalla CT, Derendorf H. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J Pharm Sci* 1997; 86(1):52-56.

206. Nolting A, Costa TD, Vistelle R, Rand KH, Derendorf H. Determination of free extracellular concentrations of piperacillin by microdialysis. *J Pharm Sci* 1996; 85(4):369-372.
207. Sarre S, Deleu D, Van Belle K, Ebinger G, Michotte Y. Quantitative microdialysis for studying the in vivo L-DOPA kinetics in blood and skeletal muscle of the dog. *Pharm Res* 1995; 12(5):746-750.
208. Deleu D, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. The effect of carbidopa and entacapone pretreatment on the L-dopa pharmacokinetics and metabolism in blood plasma and skeletal muscle in beagle dog: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 273(3):1323-1331.
209. Sasongko L, Ramzan I, Williams KM, McLachlan AJ. Muscle distribution of the neuromuscular blocker gallamine using microdialysis. *J Pharm Sci* 2002 Mar; 91(3):769-775.
210. Lonroth P, Carlsten J, Johnson L, Smith U. Measurements by microdialysis of free tissue concentrations of propranolol. *J Chromatogr* 1991; 568(2):419-425.
211. Nilsson S, Wikstrom M, Ericsson A, Wikstrom G, Waldenstrom A, Oksendal A et al. MR imaging of double-contrast enhanced porcine myocardial infarction. Correlation with microdialysis. *Acta Radiol* 1995; 36(4):346-352.
212. Nilsson S. MR imaging of contrast-enhanced porcine myocardial infarction. Assessment of reperfusion and tissue viability. *Acta Radiol Suppl* 1995; 397:1-44.
213. Larsson CI. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. *Life Sci* 1991; 49(13):L73-L78.
214. Eisenberg EJ, Conzentino P, Eickhoff WM, Cundy KC. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 29(2):93-98.

215. Eisenberg EJ, Conzentino P, Eickhoff WM, Cundy KC. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 29(2):93-98.
216. Stenken JA, Lunte CE, Southard MZ, Stahle L. Factors that influence microdialysis recovery. Comparison of experimental and theoretical microdialysis recoveries in rat liver. *J Pharm Sci* 1997; 86(8):958-966.
217. Chen HM, Shyr MH, Lau YT, Hwang TL, Chen MF. Leukocyte-endothelial adherence correlates with pancreatic nitric oxide production in early cerulein-induced pancreatitis in rats. *Shock* 1998; 10(3):218-222.
218. Hashimoto Y, Murakami T, Kumasa C, Higashi Y, Yata N, Takano M. In-vivo calibration of microdialysis probe by use of endogenous glucose as an internal recovery marker: measurement of skin distribution of tranilast in rats. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50(6):621-626.
219. Rittenhouse KD, Peiffer RL, Jr., Pollack GM. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for in vivo models of ocular absorption and disposition. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 16(6):951-959.
220. Robinson JE. Microdialysis: a novel tool for research in the reproductive system. *Biol Reprod* 1995; 52(2):237-245.
221. Iversen HH, Celsing F, Leone AM, Gustafsson LE, Wiklund NP. Nerve-induced release of nitric oxide in the rabbit gastrointestinal tract as measured by in vivo microdialysis. *Br J Pharmacol* 1997; 120(4):702-706.
222. Bolinder J, Ungerstedt U, Arner P. Long-term continuous glucose monitoring with microdialysis in ambulatory insulin-dependent diabetic patients. *Lancet* 1993; 342(8879):1080-1085.
223. During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993; 341(8861):1607-1610.

224. Kennergren C, Mantovani V, Lonroth P, Nystrom B, Berglin E, Hamberger A. Monitoring of extracellular aspartate aminotransferase and troponin T by microdialysis during and after cardioplegic heart arrest. *Cardiology* 1999; 92(3):162-170.
225. Herkner H, Muller MR, Kreischitz N, Mayer BX, Frossard M, Joukhadar C et al. Closed-chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):273-276.
226. Muller M, Mader RM, Steiner B, Steger GG, Jansen B, Gnant M et al. 5-fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res* 1997; 57(13):2598-2601.
227. Enblad P, Valtysson J, Andersson J, Lilja A, Valind S, Antoni G et al. Simultaneous intracerebral microdialysis and positron emission tomography in the detection of ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(4):637-644.
228. Jungheim K, Wientjes KJ, Heinemann L, Lodwig V, Koschinsky T, Schoonen AJ. Subcutaneous continuous glucose monitoring: feasibility of a new microdialysis-based glucose sensor system. *Diabetes Care* 2001; 24(9):1696-1697.
229. Joukhadar C, Derendorf H, Muller M. Microdialysis. A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57(3):211-219.
230. Muller M. Microdialysis in clinical drug delivery study. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45:255-269.
231. Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part II). *Clin Pharmacokinet* 1989; 17(4):275-290.

232. Lien CA, Belmont MR, Abalos A, Hass D, Savarese JJ. The nature of spontaneous recovery from mivacurium-induced neuromuscular block. *Anesth Analg* 1999; 88(3):648-653.
233. Bevan DR, Donati F, Kopman AF. Reversal of neuromuscular blockade. *Anesthesiology* 1992; 77(4):785-805.
234. Kopman AF, Mallhi MU, Justo MD, Rodricks P, Neuman GG. Antagonism of mivacurium-induced neuromuscular blockade in humans. Edrophonium dose requirements at threshold train-of-four count of 4. *Anesthesiology* 1994; 81(6):1394-1400.
235. Ostergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J. Mivacurium-induced neuromuscular blockade in patients with atypical plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37(3):314-318.
236. Laurin J, Donati F, Nekka F, Varin F. Peripheral link model as an alternative for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of drugs having a very short elimination half-life. *J Pharmacokinet Biopharm* 2001; 28(1):7-25.
237. Laurin J, Donati F, Varin F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium in young and elderly adult patients after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 2004; submitted.
238. Jacobs JR, Nath PA. Compartment model to describe peripheral arterial-venous drug concentration gradients with drug elimination from the venous sampling compartment. *J Pharm Sci* 1995; 84(3):370-375.
239. Sancho AR, Dowell JA, Wolf W. The effects of anesthesia on the biodistribution of drugs in rats: a carboplatin study. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40(6):521-525.
240. Kovar A, Dalla CT, Derendorf H. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J Pharm Sci* 1997; 86(1):52-56.

241. Nolting A, Costa TD, Vistelle R, Rand KH, Derendorf H. Determination of free extracellular concentrations of piperacillin by microdialysis. *J Pharm Sci* 1996; 85(4):369-372.
242. Bencini AF, Houwertjes MC, Agoston S. Effects of hepatic uptake of vecuronium bromide and its putative metabolites on their neuromuscular blocking actions in the cat. *Br J Anaesth* 1985; 57(8):789-795.
243. Fujibayashi Y, Takemura Y, Matsumoto K, Wada K, Yonekura Y, Konishi J et al. High myocardial accumulation of radioiodinated digoxin derivative: a possible Na,K-ATPase imaging agent. *J Nucl Med* 1992; 33(4):545-549.
244. Olinga P, Merema M, Hof IH, Slooff MJ, Proost JH, Meijer DK et al. Characterization of the uptake of rocuronium and digoxin in human hepatocytes: carrier specificity and comparison with in vivo data. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285(2):506-510.
245. Ezzine S, Donati F, Varin F. Mivacurium arteriovenous gradient during steady state infusion in anesthetized patients. *Anesthesiology* 2002; 97(3):622-629.
246. Scarsella G, Toschi G, Bareggi SR, Giacobini E. Molecular forms of cholinesterases in cerebrospinal fluid, blood plasma, and brain tissue of the beagle dog. *J Neurosci Res* 1979; 4(1):19-24.
247. Lugo SI, Liang Z, Eddington ND. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium stereoisomers in beagle dogs using twitch height and train-of-four response. *Biopharm Drug Dispos* 1998; 19(8):485-491.
248. Smith LJ, Schwark WS, Cook DR, Moon PF, Looney AL. Pharmacokinetic variables of mivacurium chloride after intravenous administration in dogs. *Am J Vet Res* 1999; 60(9):1051-1054.
249. Troconiz IF, Garrido MJ, Garcia E, Suarez E, Calvo R. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of mivacurium in rats. *J Pharm Sci* 1997; 86(2):252-256.

250. Roy J, Varin F. Physicochemical properties of neuromuscular blocking agents and their impact on the PK-PD relation. *Br J Anaesth* 2004; 93:1-8.

251. Main AR, McKnelly SC, Burgess-Miller SK. A subunit-sized butyrylcholinesterase present in high concentrations in pooled rabbit serum. *Biochem J* 1977; 167(2):367-376.

252. Levitt DG. Physiologically based pharmacokinetic modeling of arterial - antecubital vein concentration difference. *BMC Clin Pharmacol* 2004; 4(1):2.

