



Lange Kleiweg 137
Postbus 45
2280 AA Rijswijk
www.tno.nl

T 015 284 30 00
F 015 284 39 91
info-DenV@tno.nl

TNO-rapport

TNO-DV2 2005 A221

De ontwikkeling van een PBPk model voor VX;
Stand van zaken
V013-813 en 207C

Datum	februari 2006
Auteur(s)	Ing. H.C. Trap
Rubricering rapport	Ongerubriceerd
Vastgesteld door	Drs. M.W.Valstar, Apotheker, MPH
Vastgesteld d.d.	19 december 2005 (Deze rubricering wijzigt niet)
Titel	Ongerubriceerd
Managementuittreksel	Ongerubriceerd
Samenvatting	Ongerubriceerd
Rapporttekst	Ongerubriceerd
Bijlagen	-
Exemplaarnummer	13
Oplage	26
Aantal pagina's	21 (incl. bijlage, excl. RDP & distributielijst)
Aantal bijlagen	-

DISTRIBUTION STATEMENT A
Approved for Public Release
Distribution Unlimited

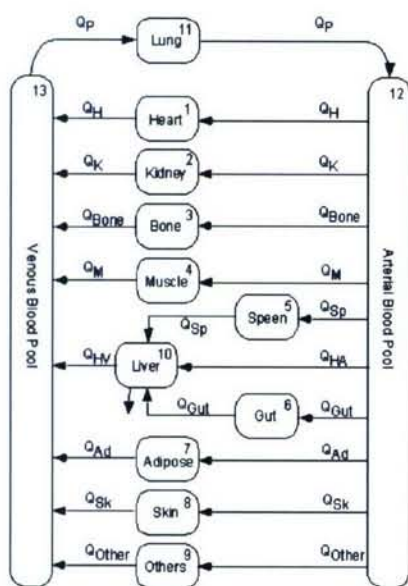
Alle rechten voorbehouden. Niets uit dit rapport mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht van het ministerie van Defensie werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van de opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de 'Modelvoorwaarden voor Onderzoeks- en Ontwikkelingsopdrachten' (MVDT 1997) tussen de minister van Defensie en TNO indien deze op de opdracht van toepassing zijn verklaard dan wel de betreffende ter zake tussen partijen gesloten overeenkomst.

© 2006 TNO

AQ F07-11-11540

De ontwikkeling van een PBPK model voor VX; Stand van zaken V013-813 en 207C



Probleemstelling

Het zenuwgas VX is een van de giftigste middelen die er is. Samen met soman, een ander zenuwgas, vormt het een grote uitdaging om personen die mogelijk worden blootgesteld aan één van deze verbindingen van een effectieve therapie te voorzien. Het is in principe voor alle strijdgassen een enorme uitdaging.

Om inzicht te krijgen in de gedragingen van VX in het lichaam zijn diverse studies uitgevoerd waarbij kleine proefdieren zijn blootgesteld aan dit middel (intraveneus en op de huid) waarna de toxicokinetiek werd bepaald. Deze methodiek levert goede

inzichten op, maar is bewerkelijk door onder andere het gebruik van proefdieren.

Computersimulaties van dergelijke studies kunnen inzicht verschaffen zonder dergelijke inspannende experimenten. Vooralsnog zijn dergelijke studies nog steeds noodzakelijk vanwege de input en validatie.

In het kader van het programma V013, 'Passieve verdediging tegen NBC-wapens' is opgenomen het ontwikkelen en opzetten van Fysiologisch gebaseerde Pharmacokinetische modellen (PBPK) welke de toxicokinetiek van soman (opgeleverd) en VX kunnen beschrijven. De ontwikkeling van dergelijke modellen staat niet op zich maar kan goed gebruikt worden om onder meer expositie scenario's en therapeutische regimes te beoordelen.

Beschrijving van de werkzaamheden

Naast het opzetten van een computermodel bestaat een groot gedeelte van de werkzaamheden uit het verzamelen van de noodzakelijke inputparameters. Naast open bronnen als de literatuur en rapporten is een flinke inspanning geleverd om via (bio)-chemisch onderzoek diverse parameters te meten. Van verschillende weefselhomogenaten van een cavia zijn experimenten uitgevoerd om de hydrolytische activiteit te kunnen kwantificeren en de verdeling van VX tussen bloed en weefsels te bepalen. De

bindingsnelheidsconstante van VX aan de (voor de mens en dier) essentiële enzymen AcetylCholine esterase (AChE), ButyrylCholine esterase (BuChE) en Carboxyl esterase (CaE) zijn gedeeltelijk bepaald.

Resultaten en conclusies

Een gedeelte van de benodigde inputparameters is vergaard of kan worden geschat. De voorspellingen van het model met betrekking tot de toxicokinetiek van VX zijn nog niet 'kloppend' met de waarden vergaard uit dierexperimenten. Dit betekent onder andere dat wellicht nog verder gesleuteld moet worden aan het model 'an sich' en dat de pogingen om de inputparameters te verzamelen gecontinueerd moeten worden.

Toepasbaarheid

Met een PBPK-model kunnen velerlei scenario's worden doorgerekend zonder kostbare dierexperimenten. Tevens vormt een dergelijk model een goede basis om uitspraken te doen over de effecten van een intoxicatie in de mens. En om in de toekomst therapie strategieën te modelleren.

De ontwikkeling van een PBPK model voor VX; Stand van zaken V013-813 en 207C

Vervolgonderzoek

In het vervolgprogramma van V013 V502 zal dit model verder worden ontwikkeld om ook de effecten en therapie in onder te brengen.

PROGRAMMA	PROJECT
Programmabegeleider A.S. de Koning, MGFB, CDC, Arts	Projectbegeleider Mevr. M.W. Valstar, Apotheker, MPH, MGFB, CDC
Programmaleider dr. M. Nieuwenhuizen, BU 4 Chemische en Biologische Bescherming	Projectleider ing. H.C. Trap, Afdeling Diagnose en Therapie
Programmatitel Passieve verdediging tegen NBC wapens	Projecttitel De ontwikkeling van een PBPK model voor VX; Stand van zaken (813 en 207C)
Programmanummer V013	Projectnummer 004.15155 en 014.15154
Programmaplanning Start 2000 Gereed 2005	Projectplanning Start 2003 Gereed 2005
Toezichthouder -	
Frequentie van overleg Met de programma/projectbegeleider werd zes maal gesproken over de invulling en de voortgang van het onderzoek.	Projectteam ing. H.C. Trap, dr. ir. M.J. van der Schans, ing. L.F. Chau, B.J. Lander, J.A. Cordia

Contact en rapportinformatie

Lange Kleiweg 137
 Postbus 45
 2280 AA Rijswijk

T 015 284 30 00
 F 015 284 39 91

info-DenV@tno.nl

TNO-rapportnummer
 TNO-DV2 2005 A221

Opdrachtnummer
 813 en 207C

Datum
 februari 2006

Auteur(s)
 ing. H.C. Trap

Rubricering rapport
 Ongerubriceerd

Samenvatting

In vervolg op de ontwikkeling van het PBPK model voor soman in de cavia en de mens wordt nu een model voor VX opgesteld. Dit rapport beschrijft beknopt de werkzaamheden en de stand van zaken om tot een PBPK model voor VX te komen. Een PBPK model kan met de fysiologie als basis (**Physiologically Based**) de lotgevallen (**Pharmaco Kinetics**) van een verbinding na blootstelling voorspellen in een dier of uiteindelijk in de mens. De toxicokinetiek van het zenuwgas VX is wezenlijk anders dan die van de zenuwgassen sarin of soman. Vooral het persistente karakter van VX bij vergelijkbare toxische dosis komt hierbij naar voren. Bij dierexperimenten is gebleken dat VX nog zeer lang na blootstelling in het lichaam in toxicologisch relevante concentraties circuleert.

Net als bij het soman model moet voor dit model een flink aantal parameters worden vergaard, hetzij via de literatuur danwel via eigen onderzoek. Als basis is het bestaande 6-compartimenten model voor soman genomen, aangepast en uitgebreid met een extra compartiment, namelijk de huid. In dit model zijn tevens de reacties met de relevante enzymen: AChE, BuChE en CaE afzonderlijk beschreven.

Met de introductie van een huid compartiment ligt nu de mogelijkheid open om dermale opnames te simuleren, welke met name voor VX van belang zijn.

Gebruikmakend van de bestaande set aan inputparameters is het niet mogelijk om de toxicokinetiek van VX na intraveneuze toediening in de (behaarde) cavia goed te voorspellen. Zodra het aantal langzame bindingsplaatsen (CaE) wordt verhoogd is het mogelijk om de toxicokinetiek van VX in de haarloze cavia goed te simuleren.

Voorlopige resultaten van percutane blootstelling geven een redelijk 'fit' van de toxicokinetiek van VX in het bloed in de haarloze cavia weer.

Summary

As a follow-up on the development of the PBPK model for soman in the guinea pig and man a new model is being developed for VX. This report describes in short the work and results which has led to this model. Based on the Physiology (**P**hysiologically-**B**ased) of the investigated species the 'fate' or kinetics (**P**harmaco **K**inetics) of a compound can be predicted after an intoxication in several organs or compartments by using a computer simulation model.

The toxicokinetics of the nerve agent VX are fundamentally different from those of the nerve agents sarin or soman. Especially the persistent character of VX in blood at equitoxic doses is apparent. Animal experiments have shown the presence of toxicologically relevant concentrations of VX in blood a long time after intoxication.

A number of input parameters need to be obtained either through literature searches or by research. The 6-compartment model for soman was adapted and expanded with an additional compartment, the skin. Also the reactions with the enzymes, AChE, BuChE and CaE were described individually.

With the implementation of a skin compartment it becomes possible to simulate dermal exposure scenarios.

Using this model and the available set of input parameters it is not yet possible to simulate the intravenous kinetics of VX in the 'normal' guinea pig. After adapting the numbers of slow binding sites (CaE) the toxicokinetics in the hairless guinea pig are simulated very well. Some preliminary simulations of percutaneous exposure also show a reasonable fit of the VX toxicokinetics in the blood of the hairless guinea pig.

Inhoudsopgave

	Managementuittreksel	2
	Samenvatting	4
	Summary	5
1	Inleiding	7
2	Methodiek	8
2.1	Isolatie van de VX isomeren.....	8
2.2	Bepalen van de hydrolysesnelheid van de isomeren.....	8
2.3	Bindingssnelheidsconstanten met AChE, BuChE en CaE.....	8
2.4	Bloed/weefsel verdeling van VX.....	9
3	(Bio-) Chemische input parameters	10
3.1	Algemene parameters	10
3.2	Hydrolyse.....	10
3.3	Bindingssnelheid van de VX-isomeren aan AChE, BuChE en CaE.....	11
3.4	Bloed/weefsel verdeling van VX.....	11
4	Het PBPK model	12
4.1	Structuur van het model.....	12
4.2	Intraveneuze simulaties in de behaarde cavia.....	13
4.3	Intraveneuze simulaties in de haarloze cavia.....	15
4.4	Oriënterende percutane simulatie in de haarloze cavia.....	17
5	Discussie en conclusie	19
6	Referenties	20
7	Ondertekening	21

1 Inleiding

In vervolg op de ontwikkeling van een PBPK¹ model voor soman in de cavia en de mens [[1] Trap 2005] wordt nu een poging ondernomen om een dergelijk model op te zetten voor VX. Met behulp van een dergelijk model kunnen de lotgevallen oftewel de toxicokinetiek van een agens in het lichaam worden voorspeld.

VX vormt door de hogere toxiciteit en persistentie ten opzichte van andere 'klassieke' zenuwgassen [[2] Van der Schans 2003] in het lichaam een flinke uitdaging om te komen tot een effectieve therapie danwel de ontwikkeling van een profylacticum. Een computersimulatiemodel dat de toxicokinetiek kan voorspellen en inzicht kan verschaffen in de secundaire reacties zoals de hydrolyse en de reacties met belangrijke enzymen kan hiertoe een belangrijke bijdrage leveren.

Tot op heden zijn nog geen aanwijzingen te vinden voor een werkend model dat de toxicokinetiek van VX kan voorspellen. Niet alleen het ontbreken van voldoende validatiegegevens zoals de toxicokinetiek in diverse relevante species, zoals de cavia en de marmoset, maar ook van de inputparameters die nodig zijn om een model te voeden, zijn hier debet aan. Recentelijk is wel door Sweeney en co-auteurs [3] een model beschreven voor de toxicokinetiek van soman. Dit vormt samen met het recent door TNO ontwikkelde model voor soman [1] een aardige basis om op voort te bouwen.

De toxicokinetiek van VX onderscheidt zich van die van de G-stoffen zoals soman en sarin [Van der Schans, 2003]. Niet alleen is zoals eerder genoemd VX meer persistent maar de eliminatie van de isomeren blijkt vooralsnog weinig stereoselectief te zijn. Onderzocht zal moeten worden in hoeverre dit valt te verklaren uit de binding aan AChE, BuChE en CaE en de hydrolyse van VX in de weefsels. Als onderdeel van dit project wordt een aantal van deze toxicant-specifieke gegevens verzameld. Het bestaande TNO-model voor soman zal worden aangepast, omdat in dat model gesproken wordt over de binding van alleen de toxische P(-) isomeren van soman met AChE en de combinatie van BuChE en CaE als 1 enzym ('Lumped E'). Het model zal derhalve worden omgebouwd om zowel de separate enzymen te kunnen volgen als ook een stereoselectieve hydrolyse.

Een belangrijke nieuwe toevoeging in het model is de mogelijkheid voor percutane toediening van VX. Damp- en vloeistofblootstellingen vormen n.l. de grootste risico's bij expositie aan VX. Tevens is uit de dierexperimenten duidelijk geworden dat relatief grote variaties in de bloedconcentraties van de VX-isomeren in de dieren onderling optreden na percutane blootstelling. Een mogelijke verklaring hiervoor zou gezocht kunnen worden bij de fysiologie en de biochemische activiteit van de huid. Bovenstaande onderschrijft dit, daarnaast is er de wens om naast de intraveneuze toediening en de respiratoire blootstelling een apart huidcompartiment op te nemen in het model om nieuwe deze relevante blootstellingsroute te incorporeren in het PBPK-model.

¹ PBPK is de engelse afkorting voor 'Physiologically-Based Pharmacokinetic'.

2 Methodiek

2.1 Isolatie van de VX isomeren

Voor het volgen en bestuderen van de biochemische activiteit van de aparte isomeren is op kleine schaal een syntheseprogramma opgestart.

Circa 6,4 gram (+)VX met een optische zuiverheid van 97,9% (HPLC gegevens) en een chemische zuiverheid van 97% (NMR gegevens) werd verkregen. De andere isomeer (-) VX werd met een opbrengst van circa 8,0 gesynthetiseerd met een optische zuiverheid van 98,4% (HPLC gegevens) en een chemische zuiverheid van 98,5% (NMR gegevens).

2.2 Bepalen van de hydrolysesnelheid van de isomeren

De enzymatische hydrolyse van VX in weefselhomogenaat afkomstig van onder andere cavia's, marmoset, rhesusaap en een stukje lever van de mens werd bepaald door de concentratie VX te meten na incubatie met het betreffende weefselhomogenaat. Om te onderzoeken of deze hydrolyse stereoselectief plaatsvindt worden de homogenaten geïncubeerd met de geïsoleerde isomeren van VX en gevolgd in de tijd.

Een serie van circa 15 Eppendorf vaatjes (2 ml) werd gevuld met met een portie weefselhomogenaat (500 µl in 25% in saline) en werd gemengd met (+)-VX of (-)-VX (eindconcentratie 10 µg/ml). De Eppendorf vaatjes werden in een waterbad geïncubeerd bij 37 °C. Op bepaalde tijden werd één vaatje uitgenomen, de interne standaard (n-propyl-VX, 50 µl a 100 µg/ml) toegevoegd, 20 µl 1N NaOH toegevoegd, en werd het VX geëxtraheerd met tweemaal 1 ml hexaan. Vervolgens werden de hexaanlagen samen-gevoegd en geanalyseerd met GC-NPD.

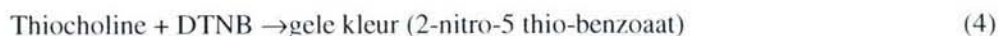
De gaschromatograaf (Fisons, Milaan Italië) was uitgerust met een NP detector en een split-splitless injector. Temperatuur van de injector en detector waren 260 en 300 °C, respectievelijk. Tijdens de injectie werd de splitleiding voor 60 s gesloten. De stationaire fase van de kolom was een CPSiL 8 (l = 25 m, i.d. = 0,25 mm, film = 1,2 µm, Varian, Middelburg). Het ovenprogramma was als volgt ingesteld: 100 °C gedurende 2 min, gevolgd door een stijging met 25 °C/min naar 250 °C, welke werd aangehouden voor 5 min, gevolgd door een stijging met 25 °C/min naar 300 °C.

2.3 Bindingsnelheidsconstanten met AChE, BuChE en CaE

Voor de bepaling van de bindingsnelheidsconstanten (k) van de VX isomeren met AChE en BuChE werd gebruik gemaakt van cavia AChE en humaan BuChE. Eerder werd door Langenberg en De Vette de bindingsnelheid van VX met CaE vastgesteld. Humaan BuChE was verkregen van een externe bron en cavia AChE is geïsoleerd uit erythrocyten. Eenmaal geïsoleerd werd een enzymatische kleuringsreactie (colorimetrische reactie, de zogenaamde Ellman reactie) uitgevoerd met de VX isomeren om de k-waarde te bepalen.

Reactievergelijkingen van de enzymkinetiek





Deze gele kleur heeft een absorptiemaximum bij 412 nm en kan met de UV/Vis spectrometer worden bepaald.

2.4 Bloed/weefsel verdeling van VX

Weefselhomogenaten (25% w/w) worden gemaakt met een veronalbuffer (niet nader beschreven) vanwege de hydrolytische afbraak van VX door andere buffers. Het is essentieel om de homogeneaatoplossing op pH 7,40 ($\pm 0,05$) te brengen in verband met de pKa van circa 9 van VX. Onder fysiologische omstandigheden is VX gedeeltelijk geladen hetgeen de partitie bepaling flink bemoeilijkt.

De bindingsplaatsen in de weefsels worden bezet door een grote overmaat aan remmer toe te voegen, vanwege de hoge affiniteit van soman voor de AChE, BuChE en CaE wordt deze gebruikt. EDTA wordt toegevoegd om de enzymatische hydrolytische activiteit te verminderen².

Bovenstaande acties worden uitgevoerd om 'alle' metabole activiteit van het homogeneaatmengsel *plat* te leggen. Vervolgens worden aan deze homogeneaatoplossingen een kleine hoeveelheid VX toegevoegd. VX zal zich gaan verdelen tussen diverse lagen in dit mengsel, na evenwichtinstelling wordt met hexaan de niet opgenomen hoeveelheid VX geëxtraheerd en vervolgens verder geanalyseerd met GC-NPD. Door de resultaten op elkaar te delen en rekening houdend met het effect van de bufferoplossing kan uiteindelijk de partitie of verdeling worden berekend [1] en [8].

² Vooralnog blijft de vraag of soman en VX dezelfde bindingsplaatsen bezetten.

3 (Bio-) Chemische input parameters

3.1 Algemene parameters

Een gedeelte van de inputparameters zoals deze voor het PBPK model voor soman zijn gebruikt kunnen onverkort worden overgenomen of daarvan worden afgeleid.

Tabel 1 Algemene inputparameters voor een PBPK model in de cavia (500 g).

Parameter	Compartimenten						
	Arterieel Bloed	Veneus Bloed	Longen	Arm-doorbloed ^{pp}	Rijk-doorbloed ^{rp}	Lever	Huid
Volume fractie	0,02	0,04	0,012	0,53	0,17	0,06	0,17
Volume (ml)	10	20	6	275	85	30	85
Bloed flow fractie #	1	1	1	0,19	0,46	0,30	0,05
Alveolaire flow (ml/s)			2				
AChE conc. (nM)	9,7	9,7	4,5	1,6	49	6,3	1
BuChE (nM) ^[5]	21	21	11	0	4	79	0
CaE (nM) ^[3]	440	440	170	5 [#]	170	20.000	5

De waarden voor volume en bloed fracties het 'poorly perfused' of armdoorbloed (pp) compartiment en die van 'richly perfused' af rijkdoorbloed compartiment (rp) zijn resultanten van gedefinieerde compartimenten. [3] Gegevens geëxtrapolerd uit Sweeney (2005), [5] Data Langenberg (2005). [#] De aantallen bindingsplaatsen of concentraties CaE in het armdoorbloed compartiment komen niet overeen met die zoals door Sweeney wordt gepubliceerd, echter zij komen meer overeen met het soman model. De grijze cellen in deze tabel zijn schattingen en moeten wellicht nog nader worden bepaald.

In PBPK modellen wordt algemeen gepostuleerd dat het lichaam voor 76% uit een armdoorbloed gedeelte en 24% uit een rijkdoorbloed gedeelte bestaat. Zodra er specifieke compartimenten worden gedefinieerd wordt dit verrekend, zie ook bovenstaande tabel. De huid samen met het bloed en het armdoorbloed compartiment moeten samen circa 76% vormen.

3.2 Hydrolyse

Met de losse isomeren is in de diverse weefselhomogenaten de hydrolyse snelheidsconstante bepaald, zie tabel 2.

Tabel 2 Hydrolyse-snelheidsconstanten voor de VX isomeren bepaald in weefselhomogenaten.

Parameter	Compartimenten						
	Arterieel Bloed	Veneus Bloed	Longen	Arm-doorbloed ^{pp}	Rijk-doorbloed ^{rp}	Lever	Huid
k_{fp} (s ⁻¹)	$4,36 \cdot 10^{-4}$	$4,36 \cdot 10^{-4}$	$2,61 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-10}$	$3,29 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-10}$
k_{fm} (s ⁻¹)	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$2,04 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-10}$	$3,33 \cdot 10^{-5}$	$4,06 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-10}$

k_{fp} is de hydrolyse snelheidsconstante voor (+) VX en k_{fm} voor die van (-) VX. De grijze cellen in deze tabel zijn schattingen en moeten wellicht nog nader worden bepaald.

De metingen in de homogenaten van de huid, rest van het lichaam en in het vet laten geen hydrolytische activiteit zien. Voorzichtigshalve is de snelheid op een erg lage waarde gezet, dit betreft de spontane hydrolyse.

3.3 Bindingssnelheid van de VX-isomeren aan AChE, BuChE en CaE

Het bepalen van deze bindingssnelheidsconstanten bleek moeilijker te zijn dan werd verwacht. Om de bindingsconstante van de VX isomeren met cavia AChE te bepalen werden eerst uit caviabloed de erythrocyten geïsoleerd en opgewerkt, waarna vervolgens de activiteit werd bepaald. Van een externe bron werd een kleine hoeveelheid humaan BuChE verkregen waarmee vervolgens de bindingsexperimenten konden worden uitgevoerd. Humaan BuChE heeft een redelijke stereoselectiviteit voor de binding van VX, respectievelijk $6,44 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ voor (+) VX en $5,61 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ voor (-) VX. Er was helaas geen cavia BuChE voorhanden om te controleren of deze stereoselectiviteit mogelijk hetzelfde zou zijn. De schatting zoals deze nu wordt gemaakt is voor (+) VX een bindingsconstante van $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en die voor (-) VX $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Door Langenberg en De Vette is de bindingssnelheidsconstante van VX met cavia CaE gemeten en bepaald op $1,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabel 3 Bindingssnelheidsconstante (\pm) VX met AChE, BuChE en CaE ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

	AChE	BuChE	CaE
(+) VX	$5,39 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^3$
(-) VX	$7,97 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^3$

De waarden voor de binding met cavia BuChE (grijze gebied) zijn schattingen en gebaseerd op de verhouding humaan BuChE en 'Electric Eel' AChE.

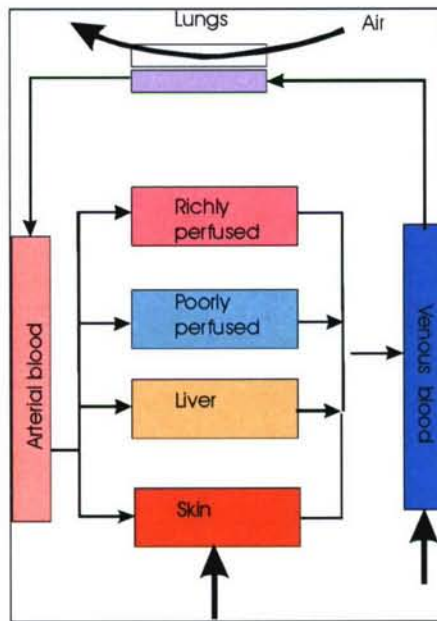
3.4 Bloed/weefsel verdeling van VX

Het blijft moeilijk om de verdeling van intact VX tussen bloed en lucht en tussen weefsel(homogenaten) en bloed te bepalen. Niet alleen is VX reactief (bindingsreacties en hydrolyse) maar kan de lading die het stikstofatoom krijgt in waterig milieu de 'recovery' flink parten spelen waardoor een en ander moeilijk interpreteerbaar wordt. Om toch het model te kunnen voeden wordt in eerste instantie gewerkt met een aantal schattingen van deze parameters. Momenteel worden de laatste werkzaamheden verricht, de resultaten zullen zo snel mogelijk in het model worden opgenomen.

4 Het PBPK model

4.1 Structuur van het model

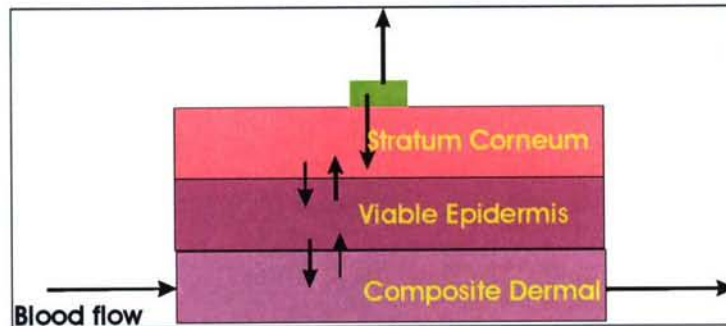
Er wordt (voorlopig³) gebruik gemaakt van de programmeertaal 'Berkeley Madonna', afkomstig van Macey en Oyster (University of California at Berkeley, CA, USA), waarmee ook ervaring is opgedaan voor het programmeren voor het soman model. In figuur 1, is de structuur van het model schematisch weergegeven. De huid is nu als apart compartiment weergegeven, tevens zijn er nu drie verschillende toedieningroutes beschikbaar.



Figuur 1 Schematische weergave van het PBPK model voor VX.

Er is niet gekozen om de huid verder te compartimenteren, zie ook figuur 2 voor een representatie van een verdeling over de huidlagen. Onder andere door het ontbreken van valide (input) gegevens van de huidlagen is het voorsnog niet zinvol deze verdeling verder door te voeren.

³ Met het werken met Berkeley Madonna is veel ervaring opgedaan de mogelijkheden voor uitbreidingen zijn beperkt, met name op het vlak van multi-scenario analyses en parameter optimalisatie. Een mogelijkheid zou kunnen zijn overstappen naar een ander platform, waardoor het programma ACSL eventueel weer in aanmerking kan komen.

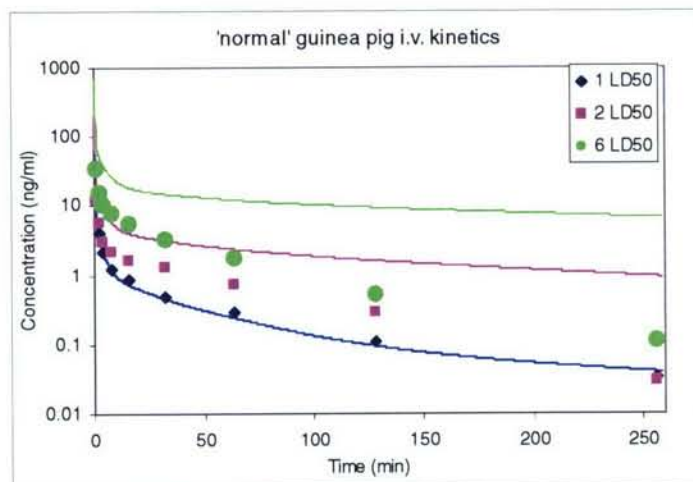


Figuur 2 Schematische weergave van een opname in de huid en de diverse huidlagen.

Er is wel een aantal gegevens bekend over de huid, zo is volgens Bookout [6] de onderverdeling in de humane huidlagen in volume procenten is circa 2%: 4%: 94% (11/560: 22/560 en 527/560), of er nog metabole activiteit in de lagen is, is nog moeilijk vast te stellen. Er zal in de komende tijd onderzocht worden wat bekend is over de penetratiesnelheid van VX door de huid.

4.2 Intraveneuze simulaties in de behaarde cavia

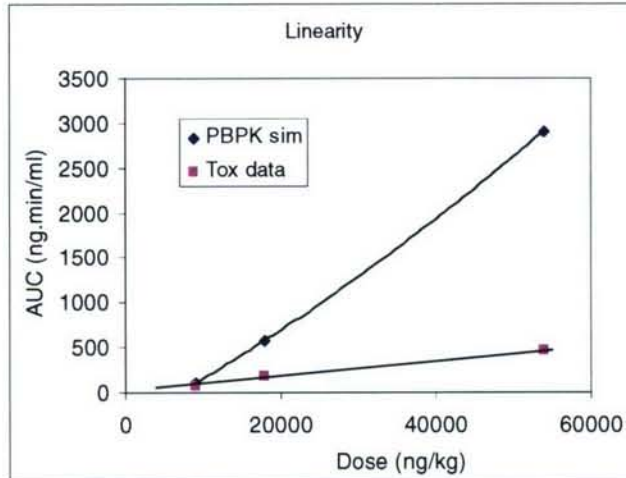
De inputparameters zoals beschreven in voorgaande paragrafen worden gebruikt in het model. Een listing van het programma wordt ditmaal niet meegeleverd. Het resultaat van een van de eerste simulaties van de intraveneuze toxicokinetiek van VX in de cavia wordt in figuur 3 weergegeven.



Figuur 3 Simulaties van de toxicokinetiek van VX na intraveneuze toediening van een hoeveelheid VX corresponderend met 1, 2 en 6 LD₅₀ (9, 18 en 54 µg/kg) in de cavia.

Zoals te zien lijkt de simulatie van 1 LD₅₀ redelijk goed te 'fitten' met het resultaat van het dierexperiment. De simulaties voor de hogere doses komen niet meer overeen zoals deze door zowel door Boone [7] met 'gewone' behaarde cavia's werd bepaald.

Er is gekeken naar de lineariteit van de oppervlakte onder toxicokinetiek-curve (AUC= Area Under the Curve) versus de toegediende dosis, zoals te zien is in figuur 4. De roze punten geven de resultaten weer van dierexperimenten en de blauwe die van de simulaties.



Figuur 4 Representatie van de lineariteit van AUC (Area Under the Curve) versus van de toegediende dosis. De rode punten representeren dierexperimenten en de blauwe die van de simulaties.

Het verband tussen AUC en de dosis zoals gemeten in, de dierexperimenten staat haaks op de verwachting dat als eenmaal de snelle bindingsplaatsen (AChE en BuChE) verbruikt zijn, de snelheid alleen nog maar wordt bepaald door de langzame bindingsplaatsen (CaE) en hydrolyse. Dit gecombineerd zou als een bi-fasisch verloop te zien moeten geven.

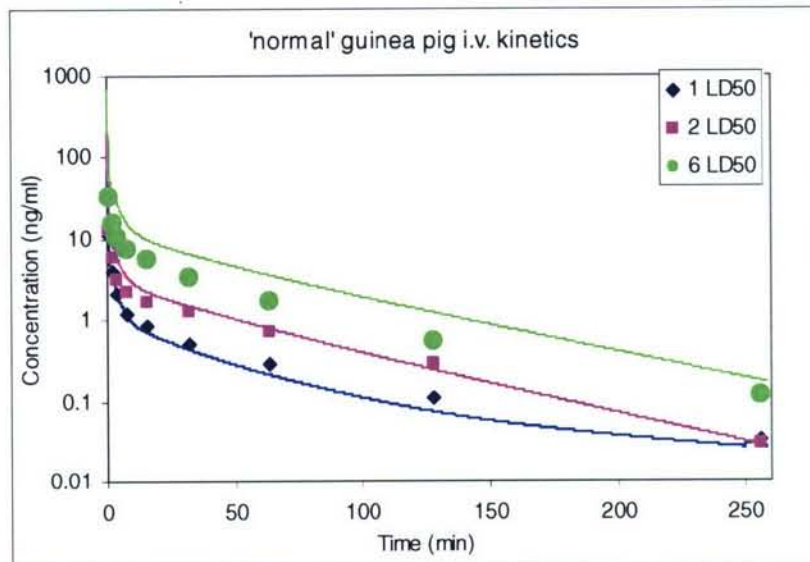
Dat de werkelijkheid toch gecompliceerder in elkaar zit moge duidelijk zijn. In principe is de ontwikkeling van de AUC versus de Dosis een lineaire verband welke het beste met een overal gelijk blijvende snelheidsconstante beschreven zou moeten/kunnen worden. Dit aspect zal nader onderzocht moeten worden.

Een mogelijkheid om hiermee om te gaan is om een groter depot aan a-specifieke bindingsplaatsen aan te leggen welke vrijkomen naarmate er meer specifieke bindingsplaatsen worden gebruikt. Dat iets dergelijks mogelijk zou plaatsvinden is een aantal jaren bekeken door aan een weefselhomogenaat van de cavia een hoeveelheid radioactief gelabeld organofosfaat (soman) toe te voegen welke meer was dan de bekende totale hoeveelheid van AChE, BuChE en CaE te samen [10]. Na incubatie bleek dat dit homogenaat veel meer organofosfaat kon opnemen. De gedachte was onder andere dat door het homogeniseren er mogelijk meer bindingsplaatsen werden vrijgemaakt. Het lijkt er nu op dat het evenwicht dat in compartimenten (lees organen) heerst tussen beschikbare actieve bindingsplaatsen en het depot aan niet direct beschikbare actieve bindingsplaatsen wordt beïnvloed door de afname van deze bindingsplaatsen door de reacties met VX. Om dit te testen is een drietal simulaties uitgevoerd met dezelfde doses als hiervoor, 1, 2 en 6 LD₅₀ (9, 18 en 54 µg/kg), waar voor elke dosis een toenemende hoeveelheid CaE beschikbaar is, zie ook tabel 4.

Tabel 4 Variaties in beschikbare concentraties CaE (nM) in de compartimenten in relatie met de dosis VX.

	Compartimenten						
	Arterieel Bloed	Veneus Bloed	Longen	Arm-doorbloed ^{pp}	Rijk-doorbloed ^p	Lever	Huid
1LD ₅₀ (9 µg/kg)	440	440	170	5	170	20.000	5
2LD ₅₀ (18 µg/kg)	650	650	275	5	2.000	60.000	5
6LD ₅₀ (54 µg/kg)	650	650	275	50	2.000	60.000	50

Een voorbeeld van de invloed van deze modificatie of de simulatie van de intraveneuze toxicokinetiek van VX in de cavia wordt in figuur 5 weergegeven.



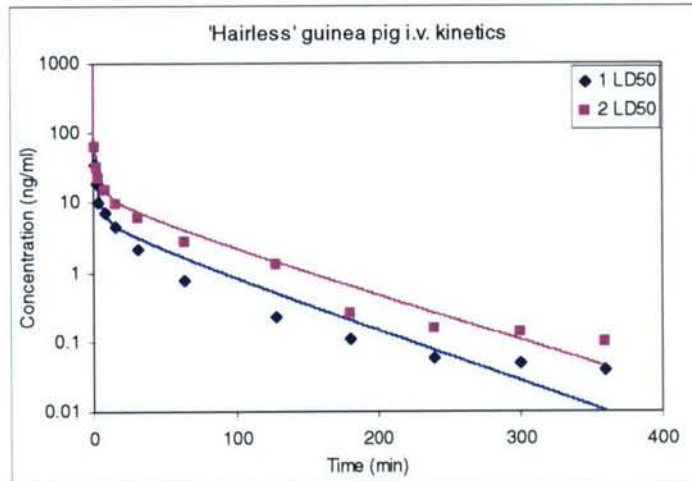
Figuur 5 Simulaties van de toxicokinetiek van VX na intra veneuze toediening van een hoeveelheid VX vergelijkbaar met 1, 2 en 6 LD₅₀ (9, 18 en 54 µg/kg) in de cavia, hierbij nemen de concentraties CaE toe met de dosis VX.

Dit concept van 'automatisch' toenemende beschikbare hoeveelheden CaE voor ontgiftig zal in het huidige model nog niet worden meegenomen.

4.3 Intraveneuze simulaties in de haarloze cavia

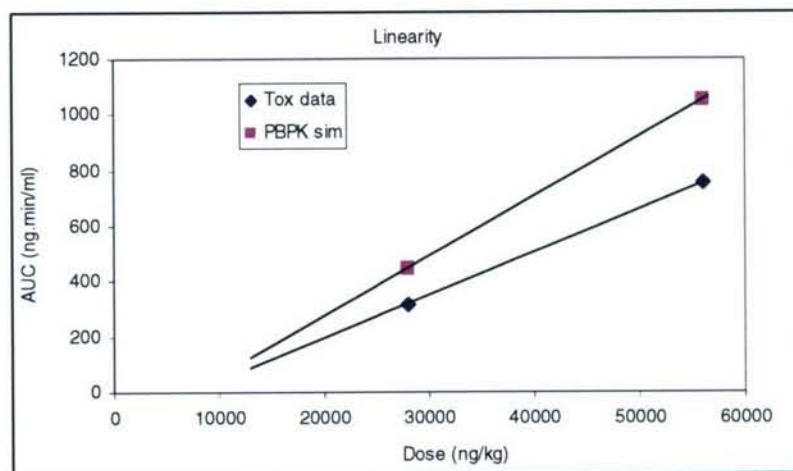
Door Van der Schans et al. [2] is de toxicokinetiek van VX in de haarloze cavia's onderzocht voor zowel intraveneuze toediening alsook de percutane toediening. Eén van de zaken die opvalt is het verschil in de letale dosis (*i.v.*) welke voor de haarloze cavia werd gevonden: 28 µg/kg versus 9 µg/kg voor die in de behaarde cavia. Dit verschil kan mogelijk worden veroorzaakt door een hoger aantal bindingsplaatsen in de haarloze cavia ten opzichte van de behaarde cavia. In hoeverre deze verhouding wordt doorgevoerd in zowel de snelle als de langzame bindingsplaatsen is onbekend.

Uitgaande van eenzelfde hoeveelheid bindingsplaatsen voor dit dier als die in oorspronkelijk in de behaarde cavia is gevonden/gebruikt levert een simulatie op, die zelf nog slechter 'fit' dan in de behaarde cavia (resultaat niet getoond). Indien ook voor dit dier de aantallen bindingsplaatsen worden opgehoogd zoals die zijn gebruikt voor 2 LD₅₀ in de behaarde cavia (tabel 4) dan lijken deze simulaties redelijk overeen te komen met de gemeten toxicokinetiek data, zie ook figuur 6.



Figuur 6 Simulaties van de toxicokinetiek van VX na intraveneuze toediening van een hoeveelheid VX corresponderend met 1 en 2 LD₅₀ (28 en 54 µg/kg) in de haarloze cavia, hierbij zijn de opgehoogde concentraties CaE toegepast.

Het verschil in de relatie tussen de AUC en de toegediende dosis lijkt door deze verhoging van CaE concentraties in de diverse compartimenten kleiner te worden in de haarloze cavia, tevens ziet er naar uit dat een redelijk lineaire respons wordt verkregen.



Figuur 7 Representatie van de lineariteit van AUC (Area Under the Curve) versus van die de toegediende dosis. De blauwe punten representeren dierexperimenten en de rode punten die van de simulaties, hierbij zijn de opgehoogde concentraties CaE toegepast.

Uiteraard is dat geen 'must', het geeft alleen aan dat het verloop boven de letale dosis (28 µg/kg) lineair blijkt te lopen. Bij sub-letale hoeveelheden is de invloed van de snelle bindingsplaatsen redelijk groot op het verloop van de concentratiecurve en daarmee ook op de AUC. De lijn loopt niet door het punt 0, de verwachting is dat hier eveneens een bi-fasisch verloop te zien zal zijn.

4.4 Oriënterende percutane simulatie in de haarloze cavia

Bij de percutane experimenten zijn haarloze cavia's besmet op de buik met een kleine hoeveelheid VX opgelost in isopropanol. Onduidelijk is nog of dit oplosmiddel een rol speelt in de absorptie van VX in de huid.

De opname van een stof (druppel) door en in de huid is afhankelijk van het expositieoppervlak, de combinatie van grootte van de druppel en de concentratie in de druppel en de penetratiesnelheid, zie ook formule 5.

$$R = \frac{K_p \times SA}{1000} \times \left(Conc_{VX} - \frac{Absorbed_{VX}}{V_{liq}} \right) \quad (5)$$

SA = Surface Area (m²)

K_p = Penetratiesnelheid (m/s)

Conc_{VX} = Concentratie VX in de druppel (mol/L)

V_{liq} = druppelgrootte (L)

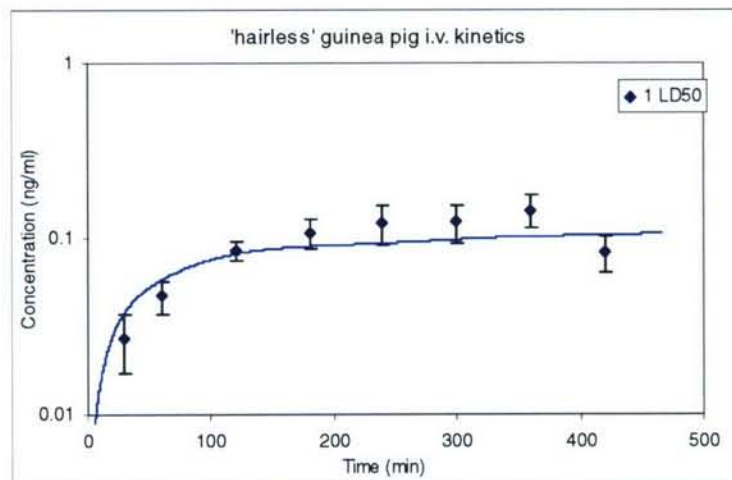
Absorbed_{VX} = Opgenomen hoeveelheid VX (mol) => deze wordt steeds uitgerekend door het model

Tabel 5 Inputparameters voor VX absorptie door de huid.

K _p (m/s)	4,8*10 ⁻⁵	(2,88 mm/min)
SA (m ²)	2*10 ⁻⁵	(2 cm ²)
Concentratie VX (mol/L)	0,046 mol/L	(12,3 µg/µl)
V _{liq} (L)	5*10 ⁻⁶	(5 µl)

Van de bovenstaande parameters zijn er drie experimenteel bepaald en vast, volume van het druppeltje, de concentratie VX daarin en het expositie oppervlak. De penetratiesnelheid is afgeleid uit de simulaties.

Gebruikmakend van bovenstaande inputparameters en die van de tabellen hiervoor wordt een simulatie verkregen die in figuur 8 staat weergegeven.



Figuur 8 Simulatie (getrokken lijn) van de percutane toxicokinetiek van VX bij 1 LD₅₀ (125 µg/kg) en de meetwaarden van de dierexperimenten.

Zo op het eerste gezicht lijkt de simulatie redelijk geslaagd. Echter bij de dierexperimenten bleek al dat waarschijnlijk (door praktische redenen) te vroeg was gestopt met het meten van de toxicokinetiek (7 hr). Nu is het nog onduidelijk of de curve over z'n maximum is en de concentratie VX in het bloed gaat minderen of dat het maximum nog niet is bereikt. De spreiding in de metingen geven nog geen eenduidig antwoord.

5 Discussie en conclusie

Een behoorlijk deel van de benodigde inputparameters is verzameld en in het model gebruikt. Dit PBPK model lijkt na gebruik van deze parameters niet direct de kinetiek goed te kunnen voorspellen. Na aanpassing van de totale hoeveelheid bindingsplaatsen oftewel de beschikbare hoeveelheid CaE in bepaalde compartimenten lijkt dit model de kinetiek van VX redelijk tot goed te voorspelen. Deze beschikbare hoeveelheid CaE lijkt afhankelijk te zijn van de aangeboden hoeveelheid VX en aangesproken te worden wanneer nodig. Preliminair experimenten, niet uitgevoerd in het kader van dit project, lijken daar ook op te wijzen.

De transformatie van het PBPK model naar een PBPK/PD model waarbij niet alleen de toxicokinetiek kan worden voorspeld maar tevens het verloop in de concentraties/activiteit van de enzymen AChE, BuChE en CaE kan door deze aanpak of gedachte wellicht positief uitvallen.

De voorspellingen van het verloop van deze enzymen bij sub-letale doses geven een te snelle en drastische afname te zien die mogelijk niet overeenkomen met de werkelijkheid. Als vervolg op dit project in het kader van V502 zal hier nader op in worden gegaan. Wellicht kan door het aanbrengen van sub-compartimenten in belangrijke target organen als de hersenen en de middenrifspier een model worden opgezet dat een betere voorspellende waarde heeft op het verloop van AChE en BuChE.

De eerste simulaties van een percutane blootstelling met VX bij de haarloze cavia waarbij gebruik wordt gemaakt van de opgewaardeerde hoeveelheden CaE in alle compartimenten lijkt al een goede 'fit' te geven. Indien de simulatie langer wordt gevolgd wordt duidelijk dat het maximum van VX in de bloedconcentratie nog lang niet is bereikt (>13 hr). Dit onderschrijft het huidige therapie scenario wat bij een VX huid intoxicatie gebruikelijk is, namelijk toediening van injecties met behulp van auto-injectoren waarin onder andere atropine zit op regelmatige tijdsindices (elke 15 minuten) na het optreden van symptomen tot een maximum van 3. Pas op de hulppost wordt het oxim met langzame tussenpozen toegediend.

Concreet zullen in V502 een aantal zaken nader worden onderzocht: de mogelijkheid van sub-compartimenten binnen een aantal belangrijke compartimenten, het inbrengen van een aantal specifieke toxicodynamische compartimenten (hersenen en mogelijk middenrif) voor het uitlezen van effect en wellicht de integratie van een therapie model (alleen voor specifieke compartimenten).

6 Referenties

- [1] Trap, H.C. en Schans, M.J. van der,
A Revised PBPK model for soman,
TNO-rapport DV2-2005 A187 (2005).
- [2] Schans, M.J. van der; Lander, B.J.; Wiel, H. van der; Langenberg, J.P. en
Benschop, H.P.,
Toxicokinetics of the nerve agent (\pm)-VX in anesthetized and atropinized hairless
guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration,
Toxicol. Appl. Pharmacol. 191, 48-62 (2003).
- [3] Sweeney, R.E.; Langenberg, J.P. en Maxwell, D.M.,
A PBPK model for soman in multiple species,
To be published.
- [4] Boter, H.L. en Platenburg, D.H.J.M.,
Rec. Trav. Chim., **86** (No.4), 399-404.
- [5] Langenberg, J.P.,
Effect of pre-treatment with human Butyrylcholinesterase scavengers on the
toxicokinetics and binding of nerve agents in guinea pig and marmosets,
Final report DAMD17-00-2-0032 (2005).
- [6] Bookout Jr., R.L.; McDaniel, C.R.; Quinn, D.W. en McDougal, J.N.,
Multilayered dermal subcompartments for modelling chemical absorption, SAR
and QSAR,
In Environ. Res., vol 5, 133-150 (1996).
- [7] Boone, C.M.,
Toxicokinetics of VX in the guinea pig,
Unpublished results (2005).
- [8] Trap, H.C. en Van de Berg, R.M.,
Modelering respiratoire blootstelling aan reactieve industriële chemicaliën, met
name ethyleenoxide, TNO rapport (2002).
- [9] Moes, G.W.,
Synthesis of VX isomers,
Personal communication, (2005).
- [10] Langenberg, J.P.; Van Dijk, C.; Sweeney, R.E.; Maxwell, D.M.; De Jong, L.P.A.
en Benschop, H.P.
Development of a physiologically based model for the toxicokinetics of C(\pm)P(\pm)-
soman in the atropinized guinea pig,
Arch. Toxicol. 71, 320-331 (1997).

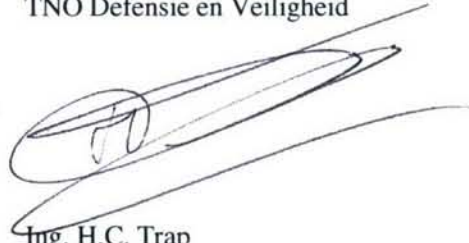
7 Ondertekening

Rijswijk, februari 2006

TNO Defensie en Veiligheid

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a smaller 'J' and a horizontal line extending to the right.

Ir. J. Schaafsma
Groepshoofd

A handwritten signature in black ink, featuring a large, circular loop followed by a horizontal line extending to the right.

Ing. H.C. Trap
Auteur

Distributielijst

Onderstaande instanties/personen ontvangen een volledig exemplaar van het rapport.

- 1 DMO/SC-DR&D
standaard inclusief digitale versie bijgeleverd op cd-rom
- 2/3 DMO/DR&D/Kennistransfer
- 4 Programmabegeleider V013
CDC/MGFB, A.S. de Koning
- 5 Projectbegeleider Defensie
MPH, MGFB, CDC, M.W. Valstar, Apotheker
- 6 DMG
Lkol B. Lam
- 7/8 DMIVD, Kabinet
- 9 CJKC NBC,
Lkol C.A. Bourgondiën
- 10 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Programmaleider V013
dr. ir. M.S. Nieuwenhuizen
- 11/13 Bibliotheek KMA
- 14 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Manager BC Bescherming (operaties), ir. R.J.A. Kersten
- 15 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Manager BC Bescherming (kennis), dr. R.W. Busker
- 16/17 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Informatie- en Documentatiedienst
- 18/24 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Business Unit BC Bescherming,
ir. J. Schaafsma, ing. H.C. Trap, dr. ir. M.J. van der Schans, ing. L.F. Chau,
J.P. Oostdijk, B.J. Lander, J.A. Cordia
- 25 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Marketing en Communicatie, digitale versie via Archief
- 26 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
afdeling Tekstverwerking (digitale versie)

**Onderstaande instanties/personen ontvangen het managementuittreksel
en de distributielijst van het rapport.**

- 4 ex. DMO/SC-DR&D
- 1 ex. DMO/ressort Zeesystemen
- 1 ex. DMO/ressort Landsystemen
- 1 ex. DMO/ressort Luchtsystemen
- 2 ex. BS/DS/DOBBP/SCOB
- 1 ex. MIVD/AAR/BMT
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, Algemeen Directeur,
ir. P.A.O.G. Korting
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, Directie
Directeur Operaties, ir. C. Eberwijn
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, Directie
Directeur Kennis, prof. dr. P. Werkhoven
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, Directie
Directeur Markt, G.D. Klein Baltink
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Den Haag,
Manager Waarnemingssystemen (operaties), dr. M.W. Leeuw
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Den Haag,
Manager Beleidsstudies Operationele Analyse &
Informatie Voorziening (operaties), drs. T. de Groot
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Manager Bescherming, Munitie en Wapens (operaties), ir. P.J.M. Elands
- 1 ex. TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Soesterberg,
Manager Human Factors (operaties), drs. H.J. Vink
- 1 ex. Maj. M.A. Grisnigt
DS/DOBBP/Operationeel Beleid
- 1 ex. Lkol mr. R.C. Nulkes
DS/IMS/Afd. Navo-EU/Stafofficier Navo,
nucleaire en non-proliferatiezaken
- 1 ex. D.M. van Weel, HDAB 1 ex. Drs. E.S.A. Brands, DJZ/IJB 1 ex. Lkol A.
Solkesz, HDP/DPB 1 ex. Maj. R.F.M. Schröder, Las/PBDL/OB 1 ex. Maj R.
Brunsting Bc, BS/DS/DOBBP/B 1 ex W. Vermeer, DMO/Matlogco 1 ex
H.G.B. Reulink, LBBKL/KPU-bedrijf