



Ztráta agresivity u makaka po nasální aplikaci kombinace ketamin – midazolam - remifentanil – hyáza.  
The loss of aggression in macaque after ketamin – midazolam - remifentanil combination applied nasally.

Foto/Photo by Ladislav Hess

## Hyaluronidáza urychluje nástup účinku anestetik u králíka a makaka rhesus i po nasální aplikaci

## Hyaluronidasis speed up the anaesthetic effect after nasal application in rabbit and rhesus macaque

LADISLAV HESS  
PEM IKEM Praha

### Úvod

Hyaluronidáza (zkráceně také hyáza) je hydrolytický enzym, který působí v intersticiální mezibuněčné substanci, kde štěpí kyselinu hyaluronovou. Ta je jedna z hlavních součástí mezibuněčné substance a současně má rozsáhlé použití v kosmetologii. Hyáza redukuje viskózní intercelulární cement a zvyšuje permeabilitu buněčných membrán a stěny cév. Optimální pH je 3,7-4,0. Podává se intravenózně, subkutánně nebo intramuskulárně. Poločas vylučování je 1 – 2 hod. Enzymatická aktivita v tkáních však přetrvává nejméně 12 hodin (FARR A SPOL. 1997).

Ve veterinární anesteziologii je velmi důležité, aby při použití distančních systémů byl účinek anestetik co nejrychlejší. Proto je součástí anestetických směsí i hyaluronidáza. Rychlost nástupu účinku se zkrátí až o 50 %, dochází k redukci dávkování farmak a k prohloubení účinku. Je s výhodou používána při imobilizaci zvířat v přírodních rezervacích, farmách, oborách i v zoologických zahradách (WIESNER, VON HEGEL 1985).

Stále častěji se setkáváme v humánní i veterinární anesteziologii s netradičními způsoby aplikace farmak např. nazálně, bukálně nebo transdermálně (FARNSWORTH a spol. 1998, KEARNS A SPOL. 1999, KEARNS A SPOL. 2000). Nasální aplikace farmak se může uplatnit k prodloužení imobilizace nebo celkové anestézie v průběhu výkonu. Proto nás zajímalo, zda hyáza i při nasálním způsobu aplikace urychluje nástup účinku podaných farmak.

K pokusům jsme vybrali 40 králíků, kterým jsme aplikovali midazolam nasálně a s přidáním s hyázy, dále jsme testovali S+ketamin a opět s přidáním hyázy. Na 20 primátech - makacích rhesus jsme stanovili rychlost nástupu účinku a jeho hloubku při kombinaci midazolam-remifentanil-ketamin nazálně a s přidáním hyázy.

### Materiál a metodika

Při studii jsme použili celkem 40 králíků plemene činčila šedá hmotnosti 2,5 – 4,5 kg obojího pohlaví. Králíci byli chováni individuálně v klecích v místnosti s teplotou 20 – 22°C a vlhkostí 40 – 65 %. Dostávali standardní dietu a měli volný přístup k vodě. Experimenty na králících byly povoleny Etickou komisí pro pokusy na zvířatech při MZ ČR a Etickou komisí v IKEM.

Po 15 minutách klidu k adaptaci na laboratorní prostředí jsme u každého králíka změřili základní kardiopulsační parametry – stupeň saturace hemoglobinu kyslíkem a tepovou frekvenci. Sonda pulsního oximetru byla umístěna v zátylku zvířete, kde byla malá plocha srsti vyholena. Krevní tlak jsme měřili oscilometricky neinvazivně manžetou na přední končetině zvířete přístrojem Memoprint (Medvet – Německo).

Výchozí vyšetření bylo provedeno před podáním farmak a dále v 1 minutových intervalech až do 20. minuty. Hodnotili jsme změny chování. Zaznamenali jsme první známky sedace, které se projeví snížením pohybu vibrisů, snížením tonu svalstva a změněným držetím těla. Jako kritérium imobilizace jsme zvolili ztrátu reflexu polohy. Tu jsme testovali pokusy o obrácení zvířete do polohy na zádech v 1 minutových intervalech.

Farmaka jsme aplikovali po fixaci zvířete kovovou sondou s kulovitým zakončením, aby nedošlo k poranění nosní sliznice. V každé pokusné skupině jsme statisticky hodnotili vývoj kardiopulsačních parametrů – výchozí hodnoty versus 1., 10., 20. min. od aplikace. Mezi skupinami jsme pak srovnávali rychlost nástupu ztráty reflexu polohy a rovněž kardiopulsační parametry – výchozí hodnoty versus 1., 10., 20. min. od aplikace.

K statistickému zhodnocení jsme použili ANOVA test.

## Makak rhesus

---

Testování účinku kombinace farmak midazolam-remifentanil-ketamin bez hyázy a s hyázou jsme prováděli na makacích rhesus (*Macaca mulatta*) obojího pohlaví, stáří 2–5 let, hmotnosti 3 – 5,5 kg chovaných ve firmě Biotox s.r.o. v Konárovicích u Kolína. Kolonie asi 250 makaků je zde chována ve velkých klecích s venkovními výhledy. Po povolení etickou komisí pro pokusy na zvířatech v IKEM jsme testovali kombinaci farmak vždy na 10 zvířatech v 21 denních intervalech. To nám umožnilo vzájemné srovnání účinku farmak u téhož jedince.

Poslední příjem potravy byl večer před pokusným dnem, voda byla k dispozici ad libitum až do začátku experimentu. Před začátkem experimentu jsme zkontrolovali funkčnost používaných přístrojů (pulsní oximetr, přístroj na měření krevního tlaku) a pokusná zvířata zvážili. Před imobilizací jsme podle způsobu chování sledovali, zda je klidné, neklidné nebo velmi neklidné a zaznamenali jsme hodnotnostní pořadí zvířete ve skupině, zaznamenali jsme věk a pohlaví. Následně jsme vypočítali dávkování farmaka nebo jeho kombinace pro určité zvíře a připravili injekční stříkačku s roztokem anestetika.

Po odchytní do podběráku a manuální fixaci jsme jim nasálně aplikovali kombinaci farmak. K netradičnímu způsobu aplikace jsme používali kovovou sondu s tupým zakončením. Ihned po aplikaci jsme zapojili stopky, abychom mohli celý průběh pokusu časově protokolovat. Zvíře jsme vypustili do malé klece, a sledovali změny chování. Zaznamenali jsme první známky sedace, které se projeví poklesem očních víček a poklesem hlavy, určili jsme čas prvních známek ztráty koordinace pohybu – ataxie.

Zaznamenali jsme imobilizační čas (čas od aplikace k ztrátě reflexu polohy) a čas ztráty úchopového reflexu, který často přetrvává při imobilizaci. Dále jsme sledovali případné změny svalového tonu, výskyt nechtěných pohybů, velikost zornice, výraz očí. Sledovali jsme výskyt nežádoucích účinků dechové deprese, změny srdečního rytmu, zvracení, výskyt svědění.

Jakmile jsme zvíře vyjmuli z klece, připojili jsme měřicí přístroje a začali monitorovat srdeční frekvenci a stupeň saturace hemoglobinu kyslíkem, pulsním oximetrem a měřit nekrvavým oscilometrickým způsobem krevní tlak v 5 min. intervalech. Čidlo pulsního oximetru bylo umístěno na prstech nebo na horním rtu bukalní sliznice pokusných zvířat.

Jednotlivá zvířata jsme nechali spontánně zotavit a zaznamenali první známky probouzení (např. mrkání očními víčky), zaumutí prsní polohy, posazení a úplné obnovení kognitivních schopností (zvíře při vědomí, které reaguje na přiblížení ke kleci agresivním chováním).

Ke zjištění statistických rozdílů zvířat a mezi skupinami makaků jsme použili ANOVA test.

### Midazolam 0,2 mg/kg

**Vliv na CNS:** Ztráta reflexu polohy nastala ve všech případech za  $106,0 \pm 15,0$  sekund. Ve třech případech trvala více než 20 minut, nejméně trvala 10 minut.

**Srdeční frekvence:** Stoupla z výchozích  $235,6 \pm 34,0$  tepů/min na  $250,8 \pm 29,4$  tepů/min v 5. minutě a dále stoupla na  $255,8 \pm 30,3$  tepů/min v 10. minutě a na  $258,8 \pm 31,3$  tepů/min v 15. minutě. Mezi 15. a 20. minutou o něco klesla, takže byla  $244,4 \pm 29,2$  tepů/min ve 20. minutě.

**Saturace hemoglobinu kyslíkem:** Klesla z výchozích  $98,2 \pm 0,4$  % na  $97,2 \pm 1,5$  % v 5. minutě a dále stoupla, takže v 10. minutě byla  $98,4 \pm 0,5$  % a  $98,2 \pm 1,5$  % v 15. minutě a  $98,2 \pm 1,2$  % ve 20. minutě.

**Systolický krevní tlak:** Klesl z výchozích  $112,2 \pm 16,5$  torrů na  $109,6 \pm 12,7$  torrů v 5. minutě, aby dále stoupl na  $122,2 \pm 12,0$  torrů v 15. minutě. Ve 20. minutě následoval pokles na  $108,8 \pm 8,9$  torrů. Diastolický a střední arteriální tlak se chovaly podobně.

### Midazolam 0,2 mg/kg – hyáza 150 m.j.

**Vliv na CNS:** Ztráta reflexu polohy nastala ve všech případech za  $66,0 \pm 25,2$  sekund. Ve všech případech trvala více než 20 minut.

**Srdeční frekvence:** Klesla z výchozích  $257,3 \pm 16,5$  tepů/min na  $212,2 \pm 28,2$  tepů/min v 1. minutě, aby v dalších minutách dále stoupla na  $242,2 \pm 18,5$  tepů/min v 5. minutě a dále se podstatně neměnila, takže byla v 10. minutě  $244,1 \pm 19,6$  tepů/min na  $244,7 \pm 21,6$  tepů/min v 15. minutě a  $244,4 \pm 16,0$  tepů/min ve 20. minutě.

**Saturace hemoglobinu kyslíkem:** Klesla z výchozích  $99,0 \pm 1,0$  % na  $98,0 \pm 1,3$  % v 5. minutě aby se v dalším průběhu podstatně neměnila, takže v 10. minutě byla  $97,9 \pm 1,2$  % a  $98,4 \pm 1,1$  % v 15. minutě a  $98,5 \pm 1,4$  % ve 20. minutě.

**Systolický krevní tlak:** Klesl z výchozích  $116,7 \pm 13,4$  torrů na  $100,7 \pm 14,3$  torrů v 5. minutě, aby dále stoupl na  $113,9 \pm 12,8$  torrů v 15. minutě a ve 20. minutě na  $118,5 \pm 16,4$  torrů. Diastolický a střední arteriální tlak se chovaly podobně.

Rozdílly ve ztrátě reflexu polohy byly mezi oběma skupinami statisticky významné.

### S+ketamin (pravotočivý izomer ketaminu) 2,5 mg/kg

**Vliv na CNS:** Ke ztrátě reflexu polohy došlo v 8 případech z 10 za  $381,3 \pm 151,3$  sekund. Ztráta reflexu polohy byla delší než 20 minut ve 4 případech, v ostatních případech trvala od 13. do 16. minuty.

**Srdeční frekvence:** Klesla z výchozích  $254,7 \pm 32,8$  tepů/min na  $206,8 \pm 35,4$  v 1. minutě a na  $199,5 \pm 39,5$  ve 2. minutě, aby v dalších minutách nastal vzestup na  $228,1 \pm 40,4$  tepů/min v 5. minutě a na  $226,3 \pm 39,0$  tepů/min v 10. minutě. V dalších minutách se srdeční frekvence držela na přibližně stejné úrovni, takže v 15. minutě byla  $226,4 \pm 34,6$  tepů/min a ve 20. minutě byla  $229,3 \pm 34,4$  tepů/min.

**Saturace hemoglobinu kyslíkem:** Klesla z výchozích  $98,9 \pm 0,7$  % na  $96,6 \pm 2,4$  % v 1. minutě, aby dále stoupla v 5. minutě na  $97,4 \pm 1,7$  % a dále stoupla na  $98,0 \pm 1,2$  % v 10. minutě. V dalších minutách se v podstatě neměnila, takže byla v 15. minutě  $97,8 \pm 1,5$  % a ve 20. minutě  $97,9 \pm 0,9$  %.

**Systolický krevní tlak:** Z výchozích  $122,3 \pm 13,5$  torrů klesl na  $107,0 \pm 11,5$  torrů v 5. minutě, aby v dalších minutách mírně stoupl na  $112,8 \pm 15,0$  torrů v 10. minutě a  $110,4 \pm 12,2$  torrů ve 20. minutě.

Diastolický a střední arteriální tlak se chovaly podobně.

### S+ketamin (pravotočivý izomer ketaminu) 2,5 mg/kg – hyáza 150 m.j.

**Vliv na CNS:** Ke ztrátě reflexu polohy došlo ve všech případech za  $83,8 \pm 16,4$  sekund. Ztráta reflexu polohy byla v 9 případech delší než 20 minut, pouze v 1 případě trvala do 7 minut.

**Srdeční frekvence:** Klesla z výchozích  $256,3 \pm 24,7$  tepů/min na  $201,9 \pm 38,6$  tepů/min v 1. minutě, aby v dalších minutách stoupla na  $232,5 \pm 27,4$  tepů/min ve 2. minutě. V dalších minutách se pohybovala přibližně na této úrovni, takže v 5. minutě byla  $224,8 \pm 24,0$  tepů/min v 10. minutě  $226,7 \pm 19,0$  tepů/min, v 15. minutě  $224,8 \pm 18,5$  tepů/min a ve 20. minutě  $227,8 \pm 13,6$  tepů/min.

**Saturace hemoglobinu kyslíkem:** Klesla z výchozích  $98,5 \pm 0,8\%$  na  $94,9 \pm 2,7\%$  v 1. minutě, aby v dalších minutách opět stoupla, takže byla  $96,6 \pm 1,4\%$  v 5. minutě a  $96,5 \pm 1,4\%$  v 10. minutě. V dalších minutách došlo k mírnému vzestupu a v 15. minutě byla  $97,5 \pm 0,8\%$  a ve 20. minutě  $98,3 \pm 0,9\%$ .

**Systolický krevní tlak:** Z výchozích  $112,1 \pm 15,3$  torrů klesl na  $110,6 \pm 19,6$  torrů ve 3. minutě, v 5. minutě by  $117,1 \pm 15,5$  torrů a v dalších minutách se držel přibližně na této úrovni, takže byl v 10. minutě  $113,0 \pm 8,8$  torrů, v 15. minutě  $115,9 \pm 7,9$  a ve 20. minutě  $116,1 \pm 9,2$  torrů.

Diastolický a střední arteriální tlak se chovaly podobně.

Rozdíly ve ztrátě reflexu polohy mezi oběma skupinami jsou vysoce statisticky významné.

## Výsledky – makak

---

### **Ketamin 2,5mg/kg – midazolam 0,25 mg/kg – remifentanil 10 ug/kg**

Nástup účinku byl za  $152,0 \pm 35,2$  sec. Imobilizace byla dosažena v 5 případech za  $630,0 \pm 172,3$  v ostatních případech byla dosažena silná sedace a makak mohl být pouze lehce přidržován na stole z bezpečnostních důvodů. Ke ztrátě úchopového reflexu došlo za  $270,0 \pm 113,8$  sekund.

Saturace hemoglobinu kyslíkem byla ve 3. minutě  $96,7 \pm 3,3\%$  a v dalších minutách se udržovala přibližně na stejné úrovni, takže byla v 5. minutě  $96,9 \pm 2,7\%$ , v 10. minutě  $97,0 \pm 2,4\%$ , v 15. minutě  $96,9 \pm 3,1\%$  a ve 20. minutě  $97,5 \pm 2,5\%$ .

Tepová frekvence byla  $203,1 \pm 34,6$  tepů/min ve 3. minutě, dále se nezměnila a byla v 5. minutě  $203,8 \pm 31,2$  tepů/min, dále klesala, takže byla v 10. minutě  $197,2 \pm 29,7$  tepů/min,  $187,5 \pm 25,0$  tepů/min v 15. minutě a  $181,7 \pm 24,2$  tepů/min ve 20. minutě.

Systolický krevní tlak klesl na  $120,9 \pm 6,0$  ve 3. minutě na  $115,9 \pm 9,7$  torrů v 5 minutě, aby v dalších minutách mírně stoupl, takže byl v 10. minutě  $116,7 \pm 8,1$  torrů a ve 20 minutě  $115,7 \pm 12,1$  torrů. Podobně se choval i diastolický a střední arteriální tlak.

### **Ketamin 2,5mg/kg – midazolam 0,25 mg/kg – remifentanil 10 ug/kg – hyáza 150 m.j.**

Nástup účinku byl za  $97,0 \pm 27,6$  sec. Imobilizace byla dosažena v 9 případech z 10 za  $330,0 \pm 164,3$  sec. V 1 případě byla dosažena pouze silná sedace s lehkým přidržováním makaka na podložce z bezpečnostních důvodů. Ke ztrátě úchopového reflexu došlo za  $255,0 \pm 152,2$  sekund.

Saturace hemoglobinu kyslíkem byla ve 3. minutě  $92,3 \pm 4,6\%$ , v 5. minutě  $90,5 \pm 2,1\%$ , v 10. minutě  $93,7 \pm 2,1\%$ , v 15. minutě  $94,0 \pm 1,6\%$  a ve 20. minutě  $93,8 \pm 1,5\%$ .

Tepová frekvence klesla z výchozích  $200,1 \pm 22,4$  tepů/min ve 3. minutě na  $186,9 \pm 16,3$  tepů/min v 5. minutě a dále klesala, takže byla v 10. minutě  $181,7 \pm 17,4$  tepů/min a ve 20. minutě  $179,2 \pm 19,6$  tepů/min.

Systolický krevní tlak klesl z výchozích  $120,8 \pm 5,7$  ve 3. minutě na  $109,5 \pm 12,7$  torrů v 5 minutě a dále stoupl, takže byl v 15. minutě  $115,9 \pm 14,3$  torrů a ve 20 minutě  $117,9 \pm 9,1$  torrů. Podobně se choval i diastolický a střední arteriální tlak.

Rozdíly v počtu imobilizací a v rychlosti imobilizace jsou mezi oběma skupinami vysoce statisticky významné.

## Diskuze

---

Výsledky jasně prokázaly, že hyaluronidáza i při nasální aplikaci ovlivňuje rychlost vstřebávání anestetika a hloubku účinku jak u králíka, tak u makaka rhesus. Optimální činnost glykoproteinů na nosní sliznici je zachována při pH 4,5 – 5,5, optimální pH pro činnost hyázy je 3,7–4,0. Vstřebávání farmak nosní sliznicí závisí na celé řadě faktorů na pH farmaka, jeho disociační konstantě, velikosti molekuly i neionizovaném podílu (FARR A SPOL. 1997). Hyáza má molekulární hmotnost 60 000 a je proteinem, přesto dochází k jejímu vstřebávání. Patrně rozvolněním mezibuněčné substance nosní sliznice je usnadněn

průnik. Aplikace hyázy byla nebolestivá. I ve veterinární literatuře se stále častěji setkáváme s netradičními způsoby aplikace farmak – nazálně, bukálně nebo transdermálně (FARNSWORTH A SPOL. 1998, KEARNS A SPOL. 1999, KEARNS A SPOL. 2000). Někdy jsou farmaka touto cestou aplikována v akutních situacích k rychlému nástupu účinku. Proto nás zajímalo, zda hyáza i po nazální aplikaci urychlí nástup účinku nazálně aplikovaných farmak.

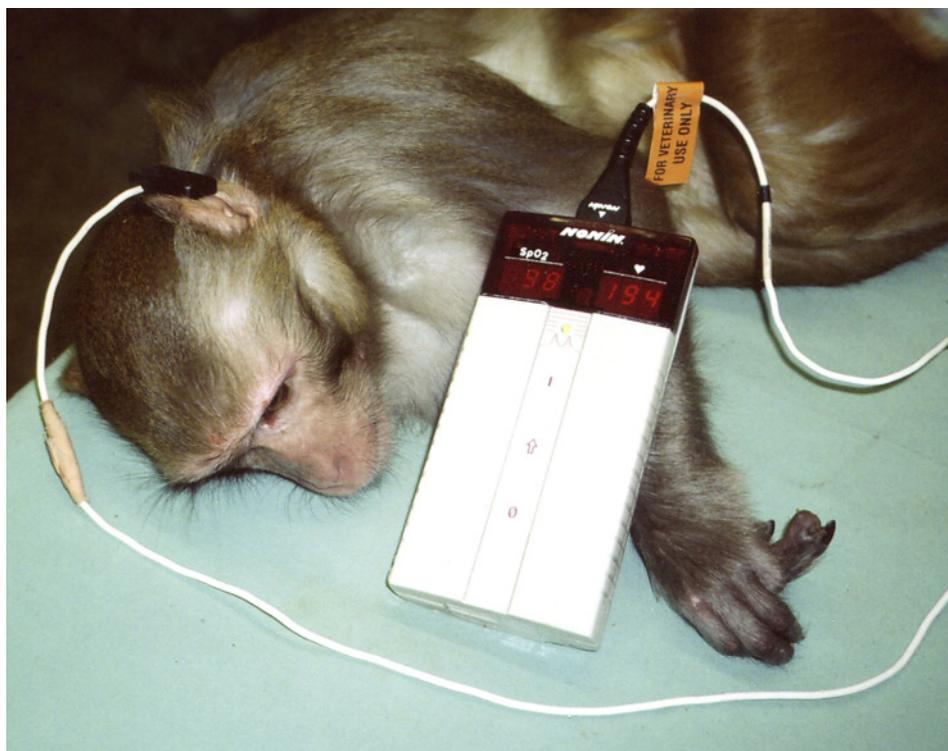
Ketamin představuje jedno z nejčastěji používaných farmak ve veterinární anesteziologii. Je proto výhodné urychlit nástup účinku jak při intramuskulární aplikaci tak i při nazální aplikaci v případech, kdy potřebujeme prodloužit imobilizaci. V dalších pokusech na králících jsme prokázali, že kromě S+-ketaminu, midazolamu, opioidů remifentanilu a sufentanilu také specifický antagonisté rozvíjejí po nasální aplikaci svůj účinek rychleji (dosud nepublikováno). To by mohlo mít zásadní význam v akutních situacích, kdy nejsme schopni rychle zajistit intravenózní přístup.

## Souhrn

---

Hyaluronidáza (hyáza) je hydrolytický enzym s molekulární hmotností 60 000, který byl poprvé izolován v roce 1928. V intercelulární buněčné substanci štěpí kyselinu hyaluronovou, která je vedle chondroitin sulfátu její hlavní součástí. Dochází k redukci viskozity intercelulárního cementu a zvýšení permeability buněčných membrán a stěny cév (FARR A SPOL. 1997). Ve veterinární anesteziologii je hyáza běžnou součástí imobilizačních směsí k urychlení nástupu účinku anestetik při použití distančních systémů. Rychlost nástupu účinku se zvyšuje až o 50 % a dojde k prohloubení účinku zvýšením plazmatických hladin podaných anestetik (WIESNER, VON HEGEL 1985). Stále častěji se setkáváme s netradičními způsoby aplikace farmak v humánní, ale i ve veterinární medicíně např. nazálně, bukálně nebo transdermálně. Imobilizaci nebo anestézii lze prodloužit nazální aplikací anestetik. Proto nás zajímalo, zda hyáza urychlí nástup a hloubku účinku i po nasální aplikaci. Ke studii jsme vybrali celkem 40 králíků, které jsme rozdělili do skupin po 10 jedincích. První skupině jsme aplikovali nazálně midazolam v dávce 0,1 mg/kg, druhé skupině jsme přidali hyázu v dávce 150 m.j., u třetí skupiny jsme podali S+-ketamin v dávce 2,5 mg/kg a ve čtvrté skupině jsme k němu opět přidali hyázu. Zaznamenali jsme rychlost nástupu účinku a ztrátu reflexu polohy. Změřili jsme základní kardiopulsační parametry. Ve skupině 20 makaků rhesus jsme u první skupiny 10 jedinců aplikovali nazálně kombinaci midazolam-remifentanil-ketamin a ve druhé skupině 10 zvířat jsme přidali hyázu. Po odchytu do odběráku a fixaci jsme kovovou sondou zakončenou olivkou aplikovali farmaka. Zaznamenali jsme první známky sedace a imobilizaci, kdy zvíře leželo bez fyzického držení na stole. Saturaci hemoglobinu kyslíkem a tepovou frekvenci jsme měřili pulsním oximetrem na prstech nebo bukální sliznici makaků. Číselné údaje jsme statisticky mezi jednotlivými skupinami hodnotili ANOVA testem. Výsledky jak u králíka, tak i u makaků jasně prokázali, že hyáza urychluje vstřebávání farmak nosní sliznicí. Zatímco při aplikaci midazolamu bez hyázy došlo u králíka ke ztrátě reflexu polohy za 1 min 45 sec., při kombinaci s hyázou za 1 min 6 sec. Ještě zřetelnější výsledky byly u S+-ketaminu. Ve skupině králíků bez hyázy došlo ke ztrátě reflexu polohy v průměru za 6 min 20 sec., ve skupině s hyázou za 1 min 25 sec ! Také u makaků rhesus došlo v 9 případech z 10 k imobilizaci v průměru za 5 minut 30 sec., ve skupině bez hyázy pouze ve 4 případech z 10 za 10,5 min! U makaka rhesuse jsme tedy prokázali nejen urychlení nástupu účinku, ale i jeho prohloubení, které bylo prokázáno počtem imobilizovaných zvířat. Kromě uvedených farmak jsme testovali nazálně s hyázou také další opioidy např. sufentanil a specifické antagonisty opioidů naloxon a naltrexon. I v těchto případech došlo k urychlení nástupu účinku. To by mohlo mít praktický význam v akutních situacích při imobilizaci zvířat, kdy je nutná aplikace specifických antagonistů, ale nemůžeme rychle zajistit žílu.

Práce vznikla s podporou grantu VG 20102015014 a VG 20102015041



Imobilizace makaka kombinací ketamin – midazolam- remifentanil – hyáza. K imobilizaci s hyázou dochází v průměru za 5,5 minut, bez hyázy za 10,5 minut ale jen u 5 zvířat z 10 .

Immobilisation in macaque by using ketamin midazolam- remifentanil - hyase combination. Mean time to total immobilisation is 5,5 min.,without hyase is it 10,5 min., but only 5 animals from 10.

Foto/Photo by Ladislav Hess

## Literatura

FARNSWORTH, S.T., GAUTHIER, M.E., MCJAMES, S.W., ZHANG, J., MAMALIS, N.,

KOPP, C.H., 1998: Ocular Transmucosal Absorption and Toxicity of Sufentanil in Dogs. *Anesth Analg* 86, 138-40.

FARR C., MENZEL J., SEEBERGER J., SCHWIEGLE B., 1997: Clinical Pharmacology and Therapeutic Use of Hyaluronidase with Special Consideration to Hylase „Dessau“. *Transplantation Wiener medizinische Wochenschrift* 147, 347 – 335.

KEARNS, K. S., SWENSON, B., RAMSAY, E.C., 1999: Dosage trials with transmucosal carfentanil citrate in non-human primates. *Zoo Biology* 18, 397-402.

KEARNS, K. S., SWENSON B., RAMSAY, E.C., 2000: Oral induction of anesthesia with droperidol and transmucosal carfentanil citrate in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31, 185-189.

WIESNER, H., HEGEL, G. VON, 1985: Praktische Hinweise zur Immobilisation von Wild-und Zootieren, *Tierärztl. Prax.* 13, 113-127.

## SUMMARY

---

Hyaluronidase (also abbreviated as hyase) is a hydrolytic enzyme that acts in the interstitial intercellular substance, where it breaks down hyaluronic acid. This is one of the main components of the intercellular substance and is currently used extensively in cosmetology. Hyase reduces the viscosity of the intercellular cement and increases the permeability of cell membranes and blood vessel walls. The optimum pH is 3.7 - 4.0. It is administered intravenously, subcutaneously or intramuscularly. The elimination half-life is 1 - 2 hours. Enzymatic activity in the tissues, however, persists for at least 12 hours.

The nasal application of pharmaceuticals can be used to extend immobilisation or general anaesthesia during an operation. It was therefore hypothesised that hyase applied nasally would accelerate the onset of a pharmaceutical's effect.

40 rabbits were used for the experiments; midazolam was applied nasally and with the addition of hyase, S + ketamine was also tested, once again with the addition of hyase. A combination of midazolam-remifentanil-ketamine and with the addition of hyase was administered nasally to 20 Rhesus macaques and the speed of the effect's onset and its depth were determined.



Ztráta agresivity makaka po nazální aplikaci ketamin – midazolam- remifentanil – hyáza. Stav za 2 minuty po aplikaci.

The loss of agresivity in macaque after ketamin – midazolam- remifentanil combination applied nasally – 2 minutes after application.

Foto/Photo by Ladislav Hess



Ztráta reflexu polohy po kombinaci S+ ketamin 2,5mg/kg – hyáza 150 m.j. nasálně. K ztrátě reflexu polohy dochází s hyázou v průměru za 1 minutu 20 sec., bez hyázy za 4,5 minuty.  
Loss of the righting position reflex after S+ ketamin 2,5mg/kg – hyasa 150 m.j. combination applied nasally. With hyasa adding comes the effect in 1 minute 20 sec. in, without 4 minutes and 20 second average. Foto/Photo by Ladislav Hess

## Material and methods

A total of 40 rabbits weighing 2.5 – 4.5 kg of both sexes were used for this study. The rabbits were kept in individual cages in a room with a temperature of 20 - 22 °C and a humidity of 40 – 65 %. They received a standard diet and had free access to water. After 15 minutes of quiet to adapt to the lab environment, each rabbit's basic cardiorespiratory parameters were measured – the degree of haemoglobin saturation with oxygen and heart rate. A pulse oximeter was placed on the animal's nape, which had been shaven for this. The oscillometric measurement of blood pressure was non-invasive on the animal's front paw using a Memoprint device (Medvet – Germany).

An initial examination was carried out before administering the pharmaceuticals then at 1-minute intervals up to 20 minutes. Changes in behaviour were noted, the first signs of sedation, the reduction in muscle tone and the change posture were recorded. The criterion for immobilisation was loss of the righting reflex. The animals were tested for returning from a position on their back in 1-minute intervals.

After fixating the animal the pharmaceuticals were applied with a metal probe with spherical ends to avoid injury to the nasal mucosa.

The development of the cardiorespiratory parameters were statistically assessed in each experimental group – the initial values versus those at 1, 10, 20 minutes from application.

The speed of the loss of the righting reflex and cardiorespiratory parameters were compared among the groups – the default values versus those at 1, 10, 20 min from application.

## Rhesus macaque

The effect of a combination of pharmaceuticals, midazolam-remifentanil-ketamine without hyase and with hyase was tested on Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) of both sexes, aged 2 - 5 years, weight 3.0 - 5.5 kg reared at Biotox s.r.o. in Konárovice near Kolín.

The last food intake was in the evening of the day before the trial, water was available ad libitum until the start of the experiment. The equipment used was checked before the experiment (pulse oximeter, a device for measuring blood pressure) and the experimental animals were weighed. Prior to immobilisation, the animals' behaviour was observed to ascertain whether they were quiet, restless or very restless and the animal's ranking in the group was recorded. Age and gender were also recorded. The dosage of the pharmaceutical or its combination was then calculated for a particular animal and a syringe was then prepared with a solution of the anaesthetic.

After being caught in a scoop net and manual fixation, the pharmaceutical combination was applied nasally. A metal probe with a blunt end was used for this unconventional application method. The animals were released into a small cage to monitor changes in behaviour. The first signs of sedation were recorded, which is indicated by drooping eyelids and a drooping head, the time of the first signs of loss of motor-coordination - ataxia - was determined.

The immobilisation time was recorded (time from application to loss of the righting reflex) and the time the grip reflex was lost, which often remains during immobilisation. Furthermore any changes in muscle tone were recorded, as were the presence of inadvertent movements, pupil size, eye expression. The presence of undesirable effects were monitored - breathing depression, cardiac rhythm changes, vomiting, itching.

An ANOVA test was used to detect statistical differences between animals and groups of macaques.

## Results – rabbit

---

### Midazolam 0.2 mg/kg

**Effect on the CNS:** Loss of righting reflex occurred in all cases after  $106.0 \pm 15.0$  seconds. In three cases it lasted more than 20 minutes, the least lasted 10 minutes.

**Heart rate:** Increased from the initial  $235.6 \pm 34.0$  beats/min to  $250.8 \pm 29.4$  beats/min after 5 minutes and further rose to  $255.8 \pm 30.3$  beats/min after 10 minutes and to  $258.8 \pm 31.3$  beats/min after 15 minutes. Between 15 and 20 minutes it fell slightly to  $244.4 \pm 29.2$  beats/min after 20 minutes.

**Saturation of haemoglobin with oxygen:** Dropped from the initial  $98.2 \pm 0.4\%$  to  $97.2 \pm 1.5\%$  after 5 minutes and further increased, after 10 minutes it was  $98.4 \pm 0.5\%$  and  $98.2 \pm 1.5\%$  after 15 minutes and  $98.2 \pm 1.2\%$  after 20 minutes.

**Systolic blood pressure:** Dropped from the initial  $112.2 \pm 16.5$  Torr to  $109.6 \pm 12.7$  Torr after 5 minutes but then rose to  $122.2 \pm 12.0$  Torr after 15 minutes. After 20 minutes there was a drop to  $108.8 \pm 8.9$  Torr. Diastolic and mean arterial pressure behaved similarly.

### Midazolam 0.2 mg/kg – hyase 150 I.U.

**Effect on the CNS:** Loss of righting reflex occurred in all cases after  $66.0 \pm 25.2$  seconds. In all cases it lasted more than 20 minutes.

**Heart rate:** Dropped from the initial  $257.3 \pm 16.5$  beats/min to  $212.2 \pm 28.2$  beats/min after 1 minute, it then rose to  $242.2 \pm 18.5$  beats/min after 5 minutes and did not change substantially afterwards, thus after 10 minutes it was  $244.1 \pm 19.6$  beats/min after 15 minutes it was  $244.7 \pm 21.6$  beats/min and after 20 minutes it was  $244.4 \pm 16.0$  beats/min.

**Saturation of haemoglobin with oxygen:** Dropped from the initial value of  $99.0 \pm 1.0\%$  to  $98.0 \pm 1.3\%$  after 5 minutes and did not change substantially afterwards, so after 10 minutes it was  $97.9 \pm 1.2\%$  and  $98.4 \pm 1.1\%$  after 15 minutes and  $98.5 \pm 1.4\%$  after 20 minutes.

**Systolic blood pressure:** Decreased from the initial  $116.7 \pm 13.4$  Torr to  $100.7 \pm 14.3$  Torr after 5 minutes and then rose to  $113.9 \pm 12.8$  Torr after 15 minutes and after 20 minutes it was  $118.5 \pm 16.4$  Torr. Diastolic and mean arterial pressure behaved similarly.

Differences in the loss of the righting reflex were statistically significant between the two groups.

### S + ketamine (dextroisomer) 2.5 mg/kg

**Effect on the CNS:** Righting reflex lost in 8 cases out of 10 after  $381.3 \pm 151.3$  seconds. Loss of righting reflex was longer than 20 minutes in 4 cases, in the other cases it lasted from the 13<sup>th</sup> to the 16<sup>th</sup> minute.

**Heart rate:** Dropped from the initial  $254.7 \pm 32.8$  beats/min to  $206.8 \pm 35.4$  after 1 minute and  $199.5 \pm 39.5$  after 2 minutes; in the following minutes it rose to  $228.1 \pm 40.4$  beats/min after 5 minutes and  $226.3 \pm 39.0$  beats/min after 10 minutes. In the following minutes the heart rate stayed at about the same level, so after 15 minutes it was  $226.4 \pm 34.6$  beats/min and after 20 minutes it was  $229.3 \pm 34.4$  beats/min.

**Saturation of haemoglobin with oxygen:** Dropped from the initial  $98.9 \pm 0.7\%$  to  $96.6 \pm 2.4\%$  after 1 minute then increased after 5 minutes to  $97.4 \pm 1.7\%$  then rose further to  $98.0 \pm 1.2\%$  after 10 minutes. In the subsequent minutes it did not change in essence, thus it was  $97.8 \pm 1.5\%$  after 15 minutes and  $97.9 \pm 0.9\%$  after 20 minutes.

**Systolic blood pressure:** From the initial value of  $122.3 \pm 13.5$  Torr it fell to  $107.0 \pm 11.5$  Torr after 5 minutes, it then rose slightly to  $112.8 \pm 15.0$  Torr after 10 minutes and  $110.4 \pm 12.2$  Torr after 20 minutes.

Diastolic and mean arterial pressure behaved similarly.

### **S + ketamine (dextroisomer of ketamine ) 2.5 mg/kg - hyase 150 I.U.**

**Effect on the CNS:** Righting reflex lost in all cases after  $83.8 \pm 16.4$  seconds. Loss of righting reflex was longer than 20 minutes in 9 cases, in just one case it lasted until the 7<sup>th</sup> minute.

**Heart rate:** Dropped from the initial  $256.3 \pm 24.7$  beats/min to  $201.9 \pm 38.6$  beats/min after 1 minute, it then rose to  $232.5 \pm 27.4$  beats/min after 2 minutes. In the following minutes it stayed at around this level, thus after 5 minutes it was  $224.8 \pm 24.0$  beats/min after 10 minutes  $226.7 \pm 19.0$  beats/min, after 15 minutes  $224.8 \pm 18.5$  beats/min and after 20 minutes  $227.8 \pm 13.6$  beats/min.

**Saturation of haemoglobin with oxygen:** Dropped from the initial  $98.5 \pm 0.8\%$  to  $94.9 \pm 2.7\%$  after 1 minute, it then rose again in the following minutes, thus it was  $96.6 \pm 1.4\%$  after 5 minutes and  $96.5 \pm 1.4\%$  after 10 minutes. There was then a slight rise and after 15 minutes it was  $97.5 \pm 0.8\%$ , and after 20 minutes  $98.3 \pm 0.9\%$ .

**Systolic blood pressure:** From the initial  $112.1 \pm 15.3$  Torr it fell to  $110.6 \pm 19.6$  Torr after 3 minutes, after 5 minutes it was  $117.1 \pm 15.5$  Torr and it then stayed at approximately this level, thus after 10 minutes it was  $113.0 \pm 8.8$  Torr, after 15 minutes  $115.9 \pm 7.9$  and after 20 minutes  $116.1 \pm 9.2$  Torr.

Differences in the loss of the righting reflex were highly statistically significant between the two groups.

## **Results – Macaque**

---

### **Ketamine 2.5 mg/kg - midazolam 0.25 mg/kg - remifentanil 10 ug/kg**

The onset was after  $152.0 \pm 35.2$  sec. In 5 cases immobilisation was achieved after  $630.0 \pm 172.3$ , in the other cases strong sedation was achieved and the macaque could be held only lightly on the table for safety reasons. Loss of grip reflex after  $270.0 \pm 113.8$  seconds.

The saturation of haemoglobin with oxygen after 3 minutes was  $96.7 \pm 3.3\%$  and for the rest of the time it remained at approximately the same level, thus after 5 minutes it was  $96.9 \pm 2.7\%$ , after 10 minutes  $97.0 \pm 2.4\%$ , after 15 minutes  $96.9 \pm 3.1\%$  and after 20 minutes  $97.5 \pm 2.5\%$ .

Heart rate was  $203.1 \pm 34.6$  beats/min after 3 minutes, it did not change and was  $203.8 \pm 31.2$  beats/min after 5 minutes, then fell, so after 10 minutes it was  $197.2 \pm 29.7$  beats/min, after 15 minutes  $187.5 \pm 25.0$  beats/min and after 20 minutes  $181.7 \pm 24.2$  beats/min.

Systolic blood pressure fell to  $120.9 \pm 6.0$  after 3 minutes to  $115.9 \pm 9.7$  Torr after 5 minutes, it then increased slightly, so after 10 minutes it was  $116.7 \pm 8.1$  Torr and after 20 minutes  $115.7 \pm 12.1$  Torr. Diastolic and mean arterial pressure behaved similarly.

### **Ketamine 2.5 mg/kg - midazolam 0.25 mg/kg - remifentanil 10 ug/kg - hydase 150 I.U.**

The onset was after  $97.0 \pm 27.6$  sec. Immobilisation was achieved in 9 cases out of 10 after  $330.0 \pm 164.3$  sec. In 1 case, only strong sedation was achieved with lightly holding the macaque down on the mat for safety reasons. Loss of grip reflex after  $255.0 \pm 152.2$  seconds.

Saturation of haemoglobin with oxygen after 3 minutes was  $92.3 \pm 4.6\%$ , after 5 minutes  $90.5 \pm 2.1\%$ , after 10 minutes  $93.7 \pm 2.1\%$ , after 15 minutes  $94.0 \pm 1.6\%$ , and after 20 minutes  $93.8 \pm 1.5\%$ .

Heart rate fell from the initial  $200.1 \pm 22.4$  beats/min after 3 minutes to  $186.9 \pm 16.3$  beats/min after 5 minutes and then fell further to  $181.7 \pm 17.4$  beats/min after 10 minutes and  $179.2 \pm 19.6$  beats/min after 20 minutes.

Systolic blood pressure fell to  $120.8 \pm 5.7$  after 3 minutes, to  $109.5 \pm 12.7$  Torr after 5 minutes, it then increased slightly, so after 15 minutes it was  $115.9 \pm 14.3$  Torr and after 20 minutes  $117.9 \pm 9.1$  Torr. Diastolic and mean arterial pressure behaved similarly.

Differences in the number of immobilisations and the immobilisation rate between the two groups are highly statistically significant.

## Discussion

---

The results clearly show that hyaluronidase, even during nasal application, affects the speed of absorption of anaesthetics and the depth of the effect in both the rabbit and the rhesus macaque. The optimal activity of glycoproteins on the nasal mucosa is maintained at a pH of 4.5 - 5.5, the optimum pH for hyase activity is 3.7 - 4.0. Absorption of pharmaceuticals by the nasal mucosa depends on a number of factors; on the pharmaceutical's pH, its dissociation constant, the size of the molecules and the non-ionised portion (FARR et al. 1997). Hyase has a molecular weight of 60,000 and is a protein, despite this it is absorbed. Evidently the loosening of the intercellular substance of the nasal mucosa facilitates absorption.

## Summary

---

Hyaluronidase (hyase) is a hydrolytic enzyme with a molecular weight of 60,000, which was first isolated in 1928. In veterinary anaesthesiology hyase is a common part of immobilisation mixtures to speed up the anaesthetic's onset when using distance systems. The onset of the effect increases by up to 50 %, and there is a deepening of the effect with an increase in the plasma levels of the anaesthetics administered (WIESNER, VON HEGEL 1985). More and more frequently unconventional means of applying pharmaceuticals are being used in both human and in veterinary medicine, for example nasally, buccally or transdermally. Immobilisation or anaesthesia can be extended by the nasal application of the anaesthetic. Therefore, it was postulated that hyase will speed up the onset and depth of the effect even after nasal application. 40 rabbits were chosen for the experiment and were divided into groups of 10 individuals. The first group, were given midazolam nasally at a dose of 0.1 mg/kg, the second group had hyase added at a dose of 150 IU, the third group had S + ketamine at a dose of 2.5 mg/kg and the fourth group again had hyase added. The speed of the onset of the effect and the loss of the righting reflex were recorded. The basic cardiorespiratory parameters were measured. In a group of 20 rhesus monkeys the first group of 10 individuals had a combination of midazolam-remifentanyl-ketamine applied nasally and 10 animals in the second group had hyase added. After being caught in a scoop net and fixated the pharmaceutical was applied using a metal probe with a rounded end. The first signs of sedation and immobilisation were recorded when the animal lay on the table without being physically held. Haemoglobin oxygen saturation and heart rate were measured with a pulse oximeter on the macaques' digits or buccal mucosa. The data between the groups were statistically assessed using the ANOVA test. The results for both rabbits and macaques clearly demonstrated that hyase speeds up absorption of pharmaceuticals by the nasal mucosa. While the application of midazolam without hyase led to the rabbit losing its righting reflex in 1 min 45 sec., when combined with hyase it was 1 min 6 sec. The results were even more pronounced for S + ketamine. Rabbits in the group without hyase lost the righting reflex on average after 6 min. 20 sec., in the group with hyase it was 1 min. 25 sec! In 9 cases out of 10 the rhesus macaque monkeys were also immobilised on average after 5 min 30 sec, in the group without hyase it was only 4 cases out of 10 after 10.5 min! Thus it was demonstrated that for the rhesus macaque not only does it speed up the onset of the effect, but also deepens it, which was proven by the number of immobilised animals. Apart from the pharmaceuticals mentioned here, two other opioids e.g. sufentanyl and the specific opioid antagonists naloxone and naltrexone, were tested nasally with hyase. In these cases too, the onset of the effect was accelerated. This could have practical significance in acute situations when immobilising animals, when it is necessary to apply specific antagonists, but a vein for injection cannot be obtained.