

Statistische Afdeling

Rapport S 62 A

door

Mej. A.M.J.A.Verbeek en

Dr J.Hemelrijk Jr

Analgesieproeven op ratten.

Aanvullend onderzoek

1. Contrôleproeven.

Het leek ons van belang het bij de eerste contrôleproef (bestaande uit 33 ratten) geconstateerde significante verschil tussen de eerste middagwaarneming zowel met de eerste als met de tweede ochtendwaarneming, nog eens door een nieuwe contrôleproef bevestigd te zien.

2e Contrôleproef.

Bij juiste opstelling van deze nieuwe contrôleproef zou dan tevens nog de invloed van enige andere factoren getoetst kunnen worden o.a. van de lengte van de rustperiode tussen twee opeenvolgende bestralingen.

Hiertoe werd een kruisproef verricht op twee groepen ieder bestaande uit 20 ratten, waarbij zowel des ochtends als des middags twee waarnemingen werden verricht en wel bij de eerste groep (groep A) met een tussenpoze van twee minuten en bij de tweede groep (groep B) met een tussenpoze van 5 minuten. De volgende dag werden de proeven op dezelfde wijze herhaald, echter werden de groepen nu omgewisseld zodat groep A op de tweede proefdag bestraald werd met tussenpozen van 5 minuten, groep B met tussenpozen van 2 minuten.

Resultaat.

1e. Met behulp van de symmetrietoets (T_2 van J.Hemelrijk) kon noch op de eerste, noch op de tweede proefdag bij ieder der groepen A en B afzonderlijk en ook niet bij samenvoeging van deze beide groepen, een significant verschil worden aangetoond tussen de eerste ochtend- en de eerste middagwaarneming, zelfs niets dat in deze richting wees (overschrijdingskansen alle $k > 0.10$).

Het bij de eerste contrôleproef gevonden verschil tussen ochtend en middag werd hierdoor dus niet bevestigd, hoewel bij deze tweede contrôleproef een groter aantal ratten gebruikt was en de proeven op de tweede

dag nog eens herhaald werden. Wij moeten dus wel aannemen dat het gevonden significante verschil tussen eerste ochtend- en eerste middagwaarneming bij de oorspronkelijke controlegroep een toevallige significantie (waarvan de kans 1:50 was) is geweest en dus niet berust op een systematisch effect, of dat daarbij toch nog een onbekende systematische factor in het spel is geweest, die zich bij de tweede controleproef niet heeft voorgedaan. Het vermoeden dat wij hier met een toevallige significantie te maken hebben wordt nog versterkt doordat de eerste ochtendwaarneming bij de eerste controleproef niet hoger lag dan de tweede ochtendwaarneming, een verschijnsel dat wij bij de totale groep van alle 835 voor de proeven gebruikte ratten zeer duidelijk geconstateerd hadden en bij de eerste controleproef ook duidelijk te voorschijn kwam bij vergelijking van de eerste en tweede middagwaarneming (rustperiode 5 min; overschrijdingskans $k = 0.008$).

2e. Het verschil tussen eerste en tweede ochtendwaarneming bleek, getoetst met behulp van de symmetrietoets, voor groep B zowel bij een rustperiode van 2 minuten, als bij een rustperiode van 5 minuten, significant en wel was de eerste ochtend waarneming groter dan de tweede (overschrijdingskans resp. $k = 0.02$ en $k = 0.013$). Bij groep A was dit verschil significant bij tussenpozen van 5 minuten ($k = 0.003$), bij een tussenpoze van 2 minuten reageerden de ratten de tweede maal wel sneller, echter niet significant sneller. Samenvoeging van beide groepen ($A + B$) gaf meer een duidelijk resultaat (overschrijdingskans $k < 0.01$).

3e. Het verschil tussen de eerste en tweede middagwaarneming was voor de beide groepen A en B afzonderlijk getoetst met behulp van de symmetrietoets, zowel bij tussenpozen van 2 minuten als bij tussenpozen van 5 minuten, duidelijk significant, met name lag de eerste middagwaarneming hoger dan de tweede middagwaarneming (overschrijdingskansen voor groep A resp. $k = 0.0002$ en $k = 0.009$; voor groep B resp. $k = 0.007$ en $k = 0.0001$).

4e. Het verschil tussen de tweede ochtendwaarneming en de eerste middagwaarneming was, getoetst met behulp van de symmetrietoets, voor groep B zowel bij een rustperiode (tussen de beide ochtendbestralingen) van 2 minuten, als bij een rustperiode van 5 minuten, duidelijk significant, met name was de eerste middagwaarne-

ming groter dan de tweede ochtendwaarneming (overschrijdingskansen resp. $k = 0.001$ en $k = 0.003$). Dit verschil was bij groep A minder duidelijk doch wees wel in die richting. Bij samenvoeging van de beide groepen (A + B) waren de overschrijdingskansen $k < 0.01$, dus duidelijk significant.

5e. Teneinde na te gaan of er nog een verschil in reactietijd was te constateren tussen beide proefdagen, vergeleken wij voor iedere rat van groep A en B afzonderlijk de eerste ochtendwaarnemingen van beide proefdagen met behulp van de symmetrietoets. Hetzelfde deden wij met de eerste middagwaarnemingen. In geen van beide gevallen kon er enig verband tussen proefdag en reactietijd geconstateerd worden (overschrijdingskansen $k > 0.10$).

Eveneens pasten wij de toets van Wilcoxon toe op de verschillen tussen eerste en tweede ochtendblanco van de ratten van groep A op de eerste proefdag en die van de ratten van groep B op de tweede proefdag (tussenpoos bestraling 2 minuten); evenzo op de dito verschillen bij groep B op de eerste met groep A op de tweede proefdag (tussenpoos 5 minuten). Hetzelfde deden wij met de verschillen tussen eerste en tweede middagblanco's.

Bij deze vergelijkingen bleek het verschil nergens significant te zijn, zodat ook op deze manier niets geconstateerd kon worden van een daginvloed op de reactietijd van de proefdieren.

Opmerking

Hiermede is nog niet aangetoond dat seizoeninvloeden of invloeden van zeer uiteenlopende weertypen, niet bestaan. Daartoe zouden controleproeven over een veel groter tijdsbestek verricht moeten worden.

Bij onderlinge vergelijking van diverse proeven blijft het dus gewenst deze alle in een kort tijdsbestek te verrichten.

6e. Van een mogelijk verschil in reactietijd bij bestraling met tussenpozen van 2 minuten en bestraling met tussenpozen van 5 minuten kon, bij samenvoeging van de groepen A en B, noch des ochtends, noch des middags, iets geconstateerd worden, er was zelfs niets dat wees in de richting van een sneller reageren na een rustperiode van 2 minuten dan an een rustperiode van 5 minuten. Deze toetsing werd uitgevoerd door vergelijking (voor iedere rat) van de tweede blanco-bepalingen na een rustperiode van 2 minuten met die na een rustperiode

van 5 minuten met behulp van de symmetrietoets. Ook werden nog de verschillen tussen eerste en tweede blanco-bepaling bij een rustperiode van 2 minuten vergeleken met die bij een rustperiode van 5 minuten met behulp van de symmetrietoets. Ook hierbij werd geen verband tussen rustperiode tussen opeenvolgende bestralingen en reactietijd van de ratten geconstateerd. Alle gevonden overschrijdingskansen waren $k > 0.10$.

Invloed injectie

Daar bij de oorspronkelijke proeven de invloed van de toegediende injectie op de reactietijd van de proefdieren niet kon worden nagegaan, werd nog een 3e controleproef verricht.

3e Controleproef.

De derde controleproef werd op dezelfde manier uitgevoerd als de oorspronkelijke proeven n.l. werden des ochtends met 2 minuten tussenpoos twee blanco waarnemingen verricht en des middags, $3/4$ uur na injectie met het gebruikte vehiculum, nog één waarneming.

Deze controleproef werd uitgevoerd op 3 groepen, ieder bestaande uit 20 ratten, waarbij groep A een intramusculaire, groep B een intraperitoneale en groep C zowel een intramusculaire als een intraperitoneale injectie kreeg.

Resultaat.

Met behulp van de methode der m-rangschikkingen zagen wij bij deze serie proeven eenzelfde verloop in de opeenvolgende waarnemingen als reeds eerder geconstateerd werd, met name lag de tweede ochtendwaarneming weer duidelijk lager dan de eerste, terwijl de eerste middagwaarneming weer hoger lag dan de tweede ochtendblanco, echter niet hoger dan de eerste ochtendblanco.

Bij vergelijking van de eerste ochtendblanco met de waarneming na injectie met behulp van de symmetrietoets kon noch bij intramusculaire, noch bij intraperitoneale injectie en ook niet bij toediening van beide injecties tegelijk, een verschil worden aangetoond in de reactietijd van de ratten, zelfs was er geen enkele aanduiding van een beïnvloeding van de reactietijd in een bepaalde richting door de toegediende injectie.

Ook bij vergelijking van de verschillen tussen eerste ochtendblanco en waarneming na injectie van de groep ratten die een intraperitoneale injectie kregen

met de groep die een intramusculaire injectie kregen, kon met behulp van de toets van Wilcoxon geen verschil geconstateerd worden. Evenmin bij onderlinge vergelijking van de groep die een intramusculaire of een intraperitoneale injectie kregen met de groep die beide injecties tegelijk kreeg toegediend.

Bij vergelijking van de tweede ochtendblanco met de waarneming na injectie was het verschil in reactietijd bij intraperitoneale zowel als bij gecombineerde injectie echter wel significant (overschrijdingskans resp. $k = 0.007$ en $k = 0.002$), met name lag de tweede blanco lager dan de waarneming na injectie. Bij intramusculaire injectie was dit verschil niet significant, echter lagen ook hier de tweede blanco-waarnemingen lager dan de waarnemingen na injectie. Dit is echter, zoals uit de voorgaande berekeningen herhaaldelijk bleek, een gewoon verschijnsel daar een tweede waarneming van een serie lager pleegt te liggen dan een eerste en kan dus zeker niet aan de injectie worden toegeschreven.

Conclusies.

- 1e. Er blijkt geen significant verschil te bestaan tussen eerste ochtend- en eerste middag-blanco-waarneming.
- 2e. Het verschil tussen tweede ochtend- en eerste middagwaarneming is echter duidelijk significant.
- 3e. Het verschil tussen eerste en tweede blanco waarneming bleek zowel des ochtends als des middags zeer duidelijk significant.
- 4e. Er valt uit deze proeven geen daginvloed op de reactietijd van de ratten te constateren bij herhaling van de proeven op twee opeenvolgende dagen.
- 5e. Wijziging van de rustperiode tussen twee opeenvolgende bestralingen van 2 minuten in 5 minuten had geen merkbare invloed op de reactietijd.
- 6e. Van enige invloed van een $3/4$ uur voor de waarneming toegediende intramusculaire of intraperitoneale of gecombineerde injectie van een vehiculum op de reactietijd van het proefdier, was uit de genomen controleproef niets te bemerken.

2. Nadere beschouwing van de proeven.

Nu uit de achteraf genomen controleproeven is gebleken dat geen rekening gehouden behoeft te worden met systematische verschillen in reactietijd tussen de 1^e ochtend- en 1^e middagwaarnemingen en ook niet met systematische verschillen t.g.v. het toedienen van een injectie, is het geoorloofd de reactievertragende werking van de bij de oorspronkelijke proeven onderzochte stoffen te toetsen voor iedere dosis afzonderlijk en wel door vergelijking van de eerste blancobepaling met de waarneming na toediening van de te onderzoeken stof. Het doel van deze verdere vergelijking was te trachten na te gaan of er nu mogelijk ook scherpere conclusies getrokken konden worden dan reeds in het eerste rapport vermeld. Wij hebben ons in dit aanvullend rapport zo beknopt mogelijk uitgedrukt, de reeds in het eerste rapport gemaakte opmerkingen werden dus achterwege gelaten.

De vergelijkingen werden uitgevoerd met behulp van de symmetrietoets T_2 van J. Hemelrijk.

I Vel A. Intraperitoneale toediening van kinine.

Tabel I^a.

Vergelijking 1^e blanco en waarneming na kinine-injectie met behulp van de symmetrie-toets.

groep	dosis mgr/kg.	overschrijdings- kans	resultaat
a	10	> 0.10 -	niet sign.
b	12.5	> 0.10 -	" "
c	15	> 0.10 +	" "
d	20	> 0.10 +	" "
e	25	0.012 +	sign.
f	30	> 0.10 +	niet sign.
(g + h)	35	0.02 +	sign.
j	40	0.012 +	"
(k + l)	45	> 0.10 +	niet sign.
(m+n+p)	50	0.03 +	sign.
q	75	0.04 +	"
r	100	0.004 +	"

(+ betekent: reactietijd na toediening van de kinine > blanco bepaling).

Conclusie:

De reactievertragende werking (in het eerste rapport "analgetisch effect" genoemd) van intraperitoneaal toegediende kinine komt bij de resultaten, vermeld in bovenstaande tabel, weer duidelijk tot uiting. Volgens de hier gevolgde methode kon deze zelfs al bij lagere doseringen kinine worden aangetoond (vergelijk Tabel I^a met Tabel I van het eerste rapport). Daar bij gebruik van de symmetrietoets bij ieder proefdier de waarneming na injectie met zijn eigen blanco vergeleken wordt en dus de variatie tussen de dieren hieruit grotendeels geëlimineerd is, zijn er van deze methode ook scherpere resultaten te verwachten dan bij gebruik van de toets van Wilcoxon, waar de beide vergeleken groepen juist uit verschillende dieren moeten zijn samengesteld. Bovendien moest in het eerste rapport steeds een hogere dosis met een lagere vergeleken worden, hetgeen geen juist beeld geeft van de werking van een bepaalde dosis kinine als zodanig.

Teneinde te trachten een functioneel verband af te leiden tussen dosis en effect, werden de gemiddelden van de stijging in reactietijd uitgezet tegen de gebruikte doses, hetzelfde werd gedaan met de medianen (zie grafiek 5^a en 5^b).

Het in het eerste rapport genoemde bezwaar nl. dat het nulpunt van de eventueel aangepaste lijn niet bekend is, kwam na het verrichten van de controleproeven te vervallen.

Vergelijking van de grafieken uit het eerste rapport (fig. 5 en 6) met die uit dit aanvullende rapport (5^a en 5^b) laat zien, dat de waarden van de verschillen tussen 2^e blanco en waarneming na injectie over de hele linie hoger liggen dan die tussen 1^e blanco en waarneming na injectie, hetgeen een weerspiegeling is van het geconstateerde feit dat, bij kort op elkaar volgende stimuli, een tweede waarneming lager ligt dan een eerste. Het is duidelijk dat het gebruik van het verschil tussen 2^e blanco en waarneming na injectie bij toepassing van de symmetrietoets aanleiding zou zijn geweest tot overschatting van de reactievertragende werking van de kinine.

Uit deze grafieken valt niets te bespeuren van een neiging tot vertraging van de reactietijd door toediening van kinine in een dosis van 10 resp. 12.5 mgr/kgr.

Gezien de grote fluctuaties bij de reacties van de groepen proefdieren op verschillende gebruikte doses kinine en het geringe aantal waarnemingen vooral in de hogere doseringen, lijkt het ons ook nu niet verantwoord een functioneel verband aan te geven tussen dosis en effect, daar de vorm der kromme, die men zou aanpassen, vrij willekeurig zou zijn. Het enige wat men wel kan zeggen, is dat de kromme monotoon stijgend zou moeten zijn.

II Vel B. Intramusculaire toediening van morphine.

Tabel II^a

Vergelijking 1^e blanco en waarneming na morphine-injectie met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.	overschrijdings- kans	resultaat
a	5	>0.10 +	niet sign.
b	5	>0.10 +	" "
c	5	>0.10 +	" "
d	5	>0.10 +	" "
e	5	0.04 +	sign.
f	5	>0.10 +	niet sign.
(a+b+c+d+e+f)	5	<0.01 +	sign.
g	7	>0.10 +	niet sign.
h	7	0.002 +	sign.
(g+h)	7	0.006 +	"
j	8	0.002 +	"
k	9	0.012 +	"
l	10	0.002 +	"
m	20	0.002 +	"

(+ betekent: reactietijd na toediening van morphine > blanco bepaling).

Conclusie:

De reactievertragende werking van morphine intramusculair toegediend, blijkt zeer duidelijk uit de resultaten vermeld in Tabel II^a. Bij de groepen a,b,c,d,e en f (ieder bestaat uit 10 ratten) afzonderlijk was het effect niet duidelijk behalve bij groep e, bij samenvoeging van de groepen bleek een dosis van 5 mgr/kgr. echter wel duidelijk werkzaam.

Uit grafiek 5^c waarin de doses morphine werden uitgezet tegen de gemiddelden van de stijging in reactietijd, blijkt, dat de hogere doseringen een sterkere reactievertragende werking hebben dan de lagere doseringen en dat de werking snel toeneemt bij kleine verhoging van de dosis. Hierbij moet er echter op gewezen worden dat deze grafiek geen juist beeld geeft van het functionele verband tussen dosis en effect omdat in de doseringen van 7 mgr/kgr. en hoger, zeer veelvuldig het verschijnsel van totaal achterwege blijven van de reactie optrad. De helling van de eventueel aan te passen lijn zou dus waarschijnlijk veel stijler moeten lopen dan de grafiek suggereert. Hetzelfde is het geval als we de mediaan van de stijging in reactietijd tegen de dosis uit zetten (zie grafiek 5^d), althans in die doses, waarbij de helft of meer dan de helft van de proefdieren geen reactie meer vertonen (dit is bij 8 mgr. reeds het geval).

III Vel C. Intraperitoneaal kinine + intramusculair morphine

Tabel III^a

Vergelijking 1^e blanco en waarneming na injectie van morphine en kinine met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis morphine mgr/kgr.	dosis kinine mgr/kgr.	overschrijdingskans	resultaat
a	5	10	0.04 +	sign.
b	5	12.5	0.04 +	"
c	5	15	0.06 +	niet sign.
d	5	20	0.012 +	sign.
e	5	25	0.012 +	"
f	5	30	0.002 +	"
g	5	35	0.002 +	"
h	5	40	0.004 +	"
j	5	50	0.002 +	"

(+ betekent: reactietijd na toediening morphine+kinine > blanco bepaling).

Conclusie:

Uit bovenstaande tabel blijkt dat 5 mgr/kgr. morphine intramusculair toegediend met elke dosis kinine ≥ 10 mgr/kgr. intraperitoneaal toegediend, een significante vertraging van de reactietijd veroorzaakt (behalve bij groep c, waarbij de overschrijdingskans echter slechts 0.06 was). Bij toename van de dosis kinine werd het effect duidelijk overtuigender.

Teneinde na te gaan of een deel der morphine vervangen zou kunnen worden door kinine, werd de totale groep van de bij de proeven onder II gebruikte ratten (a+b+c+d+e+f), die allen 5 mgr/kgr. morphine kregen toegediend, vergeleken met een dito groep onder III die tevens een dosis van 10-30 mgr/kgr. kinine kreeg (a+b+c+d+e+f), met behulp van de toets van Wilcoxon. Deze vergelijking is geoorloofd omdat bij de 3de controleproef geen invloed van de diverse vormen van injectie op de reactietijd van de proefdieren geconstateerd kon worden en omdat de eerste blanco's van de beide vergeleken groepen niet significant bleken te verschillen. Met opzet werden bij deze vergelijking de groepen g, h en j achterwege gelaten omdat bleek (zie table III^b), dat de toevoeging van een dosis van 35 mgr/kgr. kinine of meer aan een dosis van 5 mgr/kgr. morphine, de reactievertragende werking plotseling zeer sterk verhoogde.

Uit de gevonden overschrijdingskans ($k=0.013$) bij vergelijking van de verschillen tussen 1^e blanco en waarneming na injectie, met behulp van de toets van Wilcoxon, valt te concluderen, dat de tevens toegediende kinine de werkzaamheid van de morphine verhoogt. Daar reeds gebleken is dat een hogere dosis morphine ook een sterkere werking heeft dan een dosis van 5 mgr/kgr., is de conclusie gerechtvaardigd dat, teneinde een bepaalde reactievertragende werking te verkrijgen, een deel van de morphine vervangen kan worden door kinine.

De in het eerste rapport gememoreerde sterke reactievertragende werking van kinine in een dosis van slechts 5 mgr/kgr. of meer, toegediend boven een dosis van 5 mgr/kgr. morphine+30 mgr/kgr. kinine, bleek ook nu weer duidelijk bij toepassing van de toets van Wilcoxon op de verschillen tussen 1^e blanco en waarneming na injectie (Tabel III^b).

Tabel III^b

Vergelijking der verschillen tussen 1^e blanco en waarneming na injectie met behulp van de toets van Wilcoxon.

Vergeleken groepen		doseringen mgr/kgr.	verschil dosis mgr/ kgr.	overschr.- kans	resultaat
groep	groep	dosis	dosis	kinine	
C _e	B(a+b+c+d+e+f)	5M+25K	5M	25	0.08 + niet sign.
C _f	B(a+b+c+d+e+f)	5"+30"	5"	30	0.06 + " "
C _g	B(a+b+c+d+e+f)	5"+35"	5"	35	<0.00001+ sign.
C _g	C _f	5M+35K	5M+30K	5	0.003 + "

(+ betekent: reactietijd groepen in 1ste kolom > groepen in 2de kolom).

Ook de vergelijking van de doses 5 mgr/kgr. morphine + 40 resp. 50 mgr/kgr. kinine met de lagere doseringen kinine in combinatie 5 mgr/kgr. morphine toegediend, gaf hetzelfde beeld.

Deze "drempel" vonden wij ook terug in Tabel III^a. Bij toetsing met behulp van de toets van Wilcoxon bleek n.l. het verschil tussen groep C₁ (5 mgr/kgr. morphine+30 mgr/kgr. kinine) en ieder der groepen ratten die 5 mgr/kgr. morphine + een lagere dosering kinine kregen toegediend, niet significant te zijn, wél echter het verschil tussen groep C_g (5 mgr/kgr. morphine+35 mgr/kgr. kinine) en groep C₁ (overschrijdingskans $k=0.003$) en dat van groep C_g en alle lagere doseringen.

Betreffende de vraag welke morphine-kinine combinaties als equivalent te beschouwen zijn aan welke morphine-doseringen, moeten wij opmerken, dat wegens het veelvuldig optreden van het verschijnsel van totaal achterwege blijven van een reactie bij de proefdieren, een goede vergelijking niet mogelijk is met de bestaande toetsen, zodat we deze voorlopig achterwege lieten.

Conclusie:

Teneinde een bepaald reactievertragend effect te bereiken kan een deel van de intramusculair toegediende morphine vervangen worden door intraperitoneaal toegediende kinine.

De vraag welke kinine-morphine combinaties equivalent zijn aan welke morphine-doseringen is uit dit proefmateriaal nog niet volledig te beantwoorden.

IV Vel D. Intraperitoneale toediening van Symaron.

Tabel IV^a

Vergelijking 1^o blanco en waarneming na Symaron-injectie met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.	overschrijdings- kans		resultaat
a	2.5	>0.10	+	niet sign.
b	4	>0.10	+	" "
c	4.5	>0.10	-	" "
(d+e)	5	0.01	+	sign.
f	5.5	0.002	+	"
(g+h)	6	>0.10	+	niet sign.
j	7	0.06	+	" "
k	8	0.06	+	" "
l	9	0.04	+	sign.

(+ betekent: reactietijd na toediening van Symaron > blanco bepaling).

Conclusie:

Uit bovenstaande tabel blijkt dat Symaron, intraperitoneaal toegediend, in de hogere doseringen een duidelijk reactievertragende werking heeft.

In grafiek 5^e en 5^f werden resp. de gemiddelden en de medianen van de stijging in reactietijd uitgezet tegen de doses. (In dezelfde grafieken werden ook de overeenkomstige waarden getekend bij intramusculaire toediening ter onderlinge vergelijking).

Hoewel deze grafieken een rechtlijnig verband tussen dosis en effect suggereren, moet een zekere reserve in acht worden genomen, voornamelijk omdat ook hier in de hogere doseringen het verschijnsel van totaal achterwege blijven van de reactie optrad (daar dit in de afzonderlijke groepen ratten altijd in minder dan de helft van de gevallen voorkwam werden de medianen hierdoor niet beïnvloed).

Ook is het verloop van de dosis-effect lijn in de buurt van het nulpunt niet duidelijk.

V Vel E. Intramusculaire toediening van Symaron.

Tabel V^a

Vergelijking 1^e blanco en waarneming na Symaron-injectie met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.	overschrijdings- kans		resultaat
a	0.5	0.06	+	niet sign.
b	1	0.04	+	sign.
c	2	> 0.10	+	niet sign.
(d+e)	2.5	> 0.10	+	" "
(f+g)	3	0.002	+	sign.
h	3.5	0.002	+	"
j	4	0.06	+	niet sign.
k	4.5	0.06	+	" "

(+ betekent: reactietijd na toediening van Symaron > blanco bepaling.)

Conclusie:

Ook intramusculair toegediend is Symaron duidelijk reactievertragend werkzaam.

Vergelijking van de resultaten vermeld in Tabel IV^a met die van Tabel V^a laat zien dat Symaron intraperitoneaal toegediend, nog niet duidelijk werkzaam is (3/4 uur na injectie) in een dosis 5mgr/kgr., terwijl bij intramusculaire toediening een dosis van 1 mgr/kgr. al significantie opleverde en de werking vanaf 3 mgr/kgr. zeer duidelijk tot uiting kwam.

Een rechtstreekse vergelijking van de werking van Symaron intraperitoneaal toegediend met die van Symaron, intramusculair toegediend, was slechts mogelijk in 3 gevallen nl. een dosis 2,5, 4 en 4,5 mgr/kgr. (zie tabel VI 1^e rapport). Uit dit proefmateriaal is echter niet na te gaan hoe Symaron in lagere doseringen intraperitoneaal en in hogere doseringen intramusculair toegediend, zich gedraagt, waardoor generalisatie van de uit onderlinge vergelijking van slechts enkele doses verkregen resultaten, altijd enigszins dubieus is. Het zij hierbij opgemerkt dat een systematisch verschil, optredende door de vorm van injectie als zodanig, hierbij niet onder de ogen gezien behoeft te worden, daar hiervan bij de controleproef niets is gebleken.

Teneinde te trachten om alsnog een meer algemene conclusie te kunnen trekken, en aannemende dat in het midden van het waarnemingsgebied het verband tussen dosis en effect wel ongeveer rechtlijnig zal zijn (bij gebrek aan een beter gegeven), bepaalden wij voor de gemiddelden van de stijging in reactietijd bij intraperitoneale resp. intramusculaire toediening van Symaron, de aangepaste rechte lijn volgens de methode van Housner en Brennan (zie rapport S.O.1, Statistische Afdeling, Math.Centrum, van J.Hemelrijk (1949) en art.Housner en Brennan, Ann.Math.Stat. 19(1948) bladz. 380). Vervolgens projecteerden wij op een verticaal, getrokken ongeveer in het midden van het waarnemingsgebied (dosis 3.75 mgr/kgr.) elk van de punten in de richting van hun eigen aangepaste rechte lijn (zie grafiek 5^{ee}). De aldus verkregen groep geprojecteerde punten van de gemiddelden van de stijging in reactietijd bij intraperitoneale toediening werd nu vergeleken met de groep geprojecteerde punten bij intermusculaire toediening met behulp van de toets van Wilcoxon (nadat eerst de 1^e blanco's vergeleken waren), waarbij een overschrijdingskans gevonden werd van $k=0.006$, hetgeen zeer duidelijk significant is.

Hoewel deze methode niet geheel exact is, bevestigt zij toch duidelijk het resultaat verkregen door onderlinge vergelijking van overeenkomstige doses, zodat de conclusie, dat Symaron, intramusculair toegediend, 3/4 uur na injectie sterker reactievertragend werkzaam is dan intraperitoneaal toegediend, o.i. gerechtvaardigd is. Hierbij komt nog dat, wegens het vrij veelvuldig voorkomen

van een totaal achterwege blijven van de reactie bij intramusculaire toediening, de daarbij aangepaste lijn stijler zou moeten lopen dan de figuur aangeeft en dus de verschillen nog groter zouden worden, daar dit verschijnsel bij intraperitoneale toediening minder veelvuldig voorkomt. De mediaan-lijnen zouden door dit verschijnsel hier niet beïnvloed worden; daar de mediaan echter meer pleegt te schommelen dan het gemiddelde gebruikten wij toch de gemiddelden-lijnen.

Opmerking.

Zoals uit de figuur duidelijk blijkt is de grootte van het verschil in hoge mate afhankelijk van de keuze van de verticaal waarop geprojecteerd wordt. Indien wij deze nl. meer naar rechts kiezen (in de richting van de hogere doseringen), gaan de groepen geprojecteerde punten steeds duidelijker uiteen liggen, bij verschuiving naar links (in de richting van de lagere doseringen) wordt het verschil echter minder. Bij een dosis = nul behoort er geen verschil meer te constateren te zijn; hier werd dan ook geen significant verschil meer gevonden ($k=0.17$).

Tevens zouden, indien het veronderstelde rechtlijnige verband ook in de lage doseringen juist was, de aangepaste rechte lijnen de Y-as in de buurt van het nulpunt moeten snijden, hetgeen bij de "intraperitoneaal lijn" niet zo fraai uitkomt. Dit is vermoedelijk te wijten aan het feit, dat het functionele verband bij lage doses niet rechtlijnig is. Werd de projectielijn gekozen bij een dosis 1.5 mgr/kgr. dan bleek het verschil al significant, ($k=0.04$).

Conclusie:

Symaron is, intramusculair toegediend, op het tijdstip 3/4 uur na injectie, sterker reactievertragend werkzaam dan intraperitoneaal toegediend.

VI Vel F. Intramusculair Symaron+intraperitoneaal kinine.

Tabel VII^a

Vergelijking 1^e blanco en waarneming na injectie van Symaron+kinine met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis Symaron mgr/kgr.	dosis kinine mgr/kgr.	overschrijdingskans	resultaat
a	0.5	50	>0.10	niet sign.
b	0.5	75	0.02 +	sign.
c	0.5	100	0.002 +	"
d	1.0	50	0.002 +	"
e	4.5	50	0.002 +	"

(+ betekent: reactietijd na toepassing Symaron+kinine > blanco bepaling).

De reactievertragende werking van 0.5 mgr/kgr. of meer Symoron + 50 mgr/kgr. of meer kinine, blijkt duidelijk uit bovenstaande tabel, behalve bij groep a.

Betreffende de vraag of een deel der Symoron vervangen zou kunnen worden door kinine, verwijzen wij naar de resultaten onder VI van het eerste rapport, Hierbij moet echter worden opgemerkt dat, na het verrichten van de controleproeven, de invloed van de injectie buiten beschouwing gelaten kan worden.

VII Vel G. Peroraal kinine.

Na perorale toediening van kinine werden metingen verricht op de tijdstippen $\frac{1}{2}$ uur, 1 uur en $1\frac{1}{2}$ uur na toediening. Bij toepassing van de symmetrietoets op de verschillen tussen 1^e blanco bepaling en waarneming na toediening van kinine, beschouwen wij deze tijdstippen afzonderlijk. De resultaten van deze toetsing werden opgenomen in tabel IX^a.

Tabel IX^a

Vergelijking 1^e blanco en waarnemingen op de 3 tijdstippen na toediening van kinine met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.	overschrijdingskans				resultaat			
		$\frac{1}{2}$ uur	1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur	$\frac{1}{2}$ uur	1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur		
a	80	-	> 0.10	+ > 0.10	+ niet sign.	niet sign.	niet sign.		
b	100	> 0.10	- > 0.10	+ > 0.10	- " "	" "	" "	" "	" "
c	120	0.02	+ 0.06	+ > 0.10	+ sign.	" "	" "	" "	" "
d	140	> 0.10	- 0.06	+ > 0.10	+ niet sign.	" "	" "	" "	" "
(e+f+g+h)	160	< 0.01	+ > 0.10	+ 0.01	+ sign.	" "	" "	sign.	"
(j+k)	200	0.004	+ 0.04	+ 0.04	+ "	sign.	"		
(l+m)	220	0.04	+ 0.03	+ 0.08	+ "	"	niet sign.		

(+ betekent: reactietijd na toediening van kinine > blanco bepaling)

Conclusie:

Uit de resultaten in bovenstaande tabel vermeld mogen wij concluderen dat kinine, oraal toegediend, in een dosis van 160 mgr/kgr. en hoger, een duidelijk reactievertragende werking heeft. Bij grotere groepen proefdieren zal deze werking waarschijnlijk al bij kleinere doseringen duidelijk aan het licht komen.

Dat kinine, oraal toegediend, reactievertragend werkzaam is, kan ook direct afgeleid worden uit grafiek 5^e en

5^h ; het blijkt nl. dat vrijwel alle punten in beide grafieken boven de nul-lijn liggen. Toetsing van dit verschijnsel met behulp van de tekentoets leverde als overschrijdingskansen resp. $k < 0.01$ en $k = 0.01$.

Een verband tussen dosis en effect is weer niet duidelijk (zie grafieken 5^g en 5^h , waarbij de gemiddelden resp. de medianen van de stijging in reactietijd (berekend als gemiddelde over de 3 gemeten tijdstippen) werden uitgezet tegen de doses.

Een vergelijking tussen de werking van kinine oraal toegediend met die van kinine intraperitoneaal toegediend zou wel verantwoord zijn, daar van de injectie als zodanig geen invloed op de reactietijd geconstateerd kon worden. De waarnemingen werden echter niet op overeenkomstige tijdstippen verricht, nl. bij intraperitoneale toediening werd de waarneming na $3/4$ uur gedaan, bij orale toediening na $\frac{1}{2}$ uur, 1 uur en $1\frac{1}{2}$ uur. Het zou natuurlijk mogelijk zijn de stijging in reactietijd $3/4$ uur na intraperitoneale toediening van kinine te vergelijken met die op het tijdstip $\frac{1}{2}$ uur en 1 uur na orale toediening van de kinine. Daar dit echter nogal wat rekenwerk vergt en men zo toch geen juiste indruk krijgt van het verschil in werking tussen beide wijzen van toediening, lieten we dit verder achterwege. Indien gewenst kan dit alsnog geschieden.

Wel is het zonder meer duidelijk dat kinine, intraperitoneaal toegediend, al in kleinere doses werkzaam is dan peroraal toegediend.

VIII Vel H. Peroraal salicylamide.

Tabel X^a

Vergelijking 1^e blanco en waarnemingen op de 3 tijdstippen na toediening van salicylamide met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.	overschrijdingskans				resultaat				
		$\frac{1}{2}$ uur		1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur	$\frac{1}{2}$ uur	1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur		
a	50	0.02	+	>0.10	+	0.06	+	sign.	niet sign.	niet sign.
b	60	>0.10	+	0.002	+	>0.10	+	niet sign.	sign.	" "
c	70	>0.10	-	>0.10	+	>0.10	+	" "	niet sign.	" "
d	80	0.002	+	0.06	+	0.06	+	sign.	" "	" "

(+ betekent: reactietijd na toediening van salicylamide > blanco bepaling).

Conclusie:

Uit bovenstaande tabel blijkt dat salicylamide, oraal toegediend, reactievertragend werkzaam is.

Een functioneel verband tussen dosis en effect is uit dit proefmateriaal weer niet af te leiden wegens het zeer geringe aantal getoetste doses en de daarbij optredende grote fluctuaties in reactietijd.

IX Vel I. Peroraal salicylamide + kinine.

Tabel XI^a

Vergelijking 1^e blanco en waarnemingen op de 3 tijdstippen na toediening van salicylamide + kinine met behulp van de symmetrietoets.

Groep	dosis mgr/kgr.		overschrijdings-kans				resultaat		
	sal.	kin.	$\frac{1}{2}$ uur	1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur	$\frac{1}{2}$ uur	1 uur	$1\frac{1}{2}$ uur	
a	35	50	0.01	+ 0.01	+ 0.002	+ sign.	sign.	sign.	
b	35	40	0.02	+ 0.01	+ >0.10	+ "	"	niet sign.	
c	35	30	>0.10	+ >0.10	+ >0.10	- niet sign.	niet sign.	" "	
(d+e)	50	50	0.0015	+ 0.002	+ >0.10	+ sign.	sign.	" "	

(+ betekent: reactietijd na toediening salicylamide + kinine > blanco bepaling).

Conclusie:

Salicylamide en kinine, tezamen peroraal toegediend, hebben een duidelijk reactievertragende werking.

Alleen van de combinatie van 35 mgr/kgr. salicylamide + 30 mgr/kgr. kinine, kon geen reactievertragende werking worden aangetoond.

Nu bij toetsing met behulp van de symmetrietoets de reactievertragende werking van oraal toegediende kinine in hogere doseringen kon worden aangetoond, gingen wij nader in op de vraag of, om een bepaalde reactievertragende werking te bereiken, een deel der oraal toegediende salicylamide vervangen zou kunnen worden door oraal toegediende kinine.

Wij vergeleken daartoe, met behulp van de toets van Wilcoxon, de groepen ratten van de proeven onder VIII en IX. De resultaten van deze vergelijking werden opgenomen in Tabel XI^b.

Tabel XI^b

Vergelijking der verschillen tussen 1^e blanco en waarneming na toediening van de te onderzoeken stoffen met behulp van de toets van Wilcoxon.

Groep	dosis mgr/kgr		Groep	dosis mgr/kgr		overschrijdingskans			resultaat		
	sal.	kin.		sal.	kin.	na ½ uur	na 1 uur	na 1½ uur	na ½ uur	na 1 uur	na 1½ uur
H _a	50	-	I _(d+e)	50	50	0.31	+	0.19	+	0.19	→ niet sign.
H _b	60	-	I _(d+e)	50	50	0.37	+	0.70	+	0.88	- " " " "
H _a	50	-	I _a	35	50	0.03	+	0.01	+	0.10	→ sign.
H _a	50	-	I _b	35	40	0.63	+	0.18	+	0.51	- niet sign.
H _b	60	-	I _a	35	50	0.06	+	0.05	+	0.02	→ " " sign.
H _d	80	-	I _a	35	50	0.71	+	0.19	+	0.23	→ " " niet sign.

(+ betekent: reactietijd bij groep I > dan bij groep H).

Uit bovenstaande tabel vallen o.i. geen positieve conclusies te trekken. Wel trad bij vergelijking van de groep I_a (35 mgr/kgr. sal. + 50 mgr/kgr. kin.) zowel met groep H_a (50 mgr/kgr. sal.) als met groep H_b (60 mgr/kgr. sal.) significantie op, maar vergelijking van groep I_(d+e) (50 mgr/kgr. sal. + 50 mgr/kgr. kin.) zowel met groep H_a als met groep H_b wees niet op een versterking van de werking van de salicylamide door toevoeging van 50 mgr/kgr. kinine.

Conclusie:

Uit dit proefmateriaal valt niet rechtstreeks te concluderen dat, om een bepaald reactievertragend effect te bereiken, een deel der oraal toegediende salicylamide te vervangen zou zijn door kinine.

3. Conclusies.

- Kinine heeft, intraperitoneaal toegediend aan ratten, een duidelijk reactievertragende werking.
- Morphine heeft, intramusculair toegediend, ook een zeer duidelijke reactievertragende werking.
- Teneinde een bepaald reactievertragend effect te bereiken kan een deel der intramusculair toegediende morphine vervangen worden door intraperitoneaal toegediende kinine. Toevoeging van slechts 5 mgr/kgr. kinine of meer, boven een dosis van 5 mgr/kgr. morphine + 30 mgr/kgr. kinine, bleek het reactievertragende effect hiervan plotseling significant te versterken.

De vraag welke morphine-kinine combinaties equivalent zijn aan welke morphine-doseringen, is uit dit proefmateriaal niet te beantwoorden wegens het te vaak achterwege blijven van een reactie bij de proefdieren.

d) Symoron, intraperitoneaal toegediend, heeft een duidelijke reactievertragende werking.

e) Symoron, intramusculair toegediend, werkt zeer duidelijk reactievertragend.

f) Symoron is, intramusculair toegediend, op het tijdstip $3/4$ uur na injectie, sterker reactievertragend werkzaam dan intraperitoneaal toegediend.

g) Een deel der intramusculair toegediende Symoron zou, teneinde een bepaald reactieve tragend effect te bereiken, vervangen kunnen worden door intraperitoneaal toegediende kinine.

h) Kinine heeft, oraal toegediend, in hogere doseringen, een duidelijke reactievertragende werking.

Een vergelijking (op een bepaald tijdstip) van de werking van kinine, intraperitoneaal toegediend, met die van kinine, oraal toegediend, is uit dit proefmateriaal niet mogelijk. Wel is duidelijk dat bij intraperitoneale toediening de kinine reeds in lagere dosering werkzaam is dan peroraal toegediend.

j) Salicylamide, oraal toegediend, heeft een reactievertragende werking.

k) Een rechtstreeks antwoord op de vraag of, om een bepaald reactievertragend effect te bereiken, een deel der salicylamide te vervangen zou zijn door kinine, is uit dit proefmateriaal niet te geven.

l) Een functioneel verband tussen dosis en effect kan op grond van het proefmateriaal ternauwernood aangegeven worden. Wel blijkt steeds een stijgende werking bij stijgende dosis te bestaan.

Opmerking.

1^e Alle bovengenoemde conclusies gelden slechts voor het gemeten tijdstip nl. bij toediening van de te onderzoeken stof per injectie op het tijdstip $3/4$ uur na injectie, voor orale toediening op de daarvoor aangegeven tijdstippen.

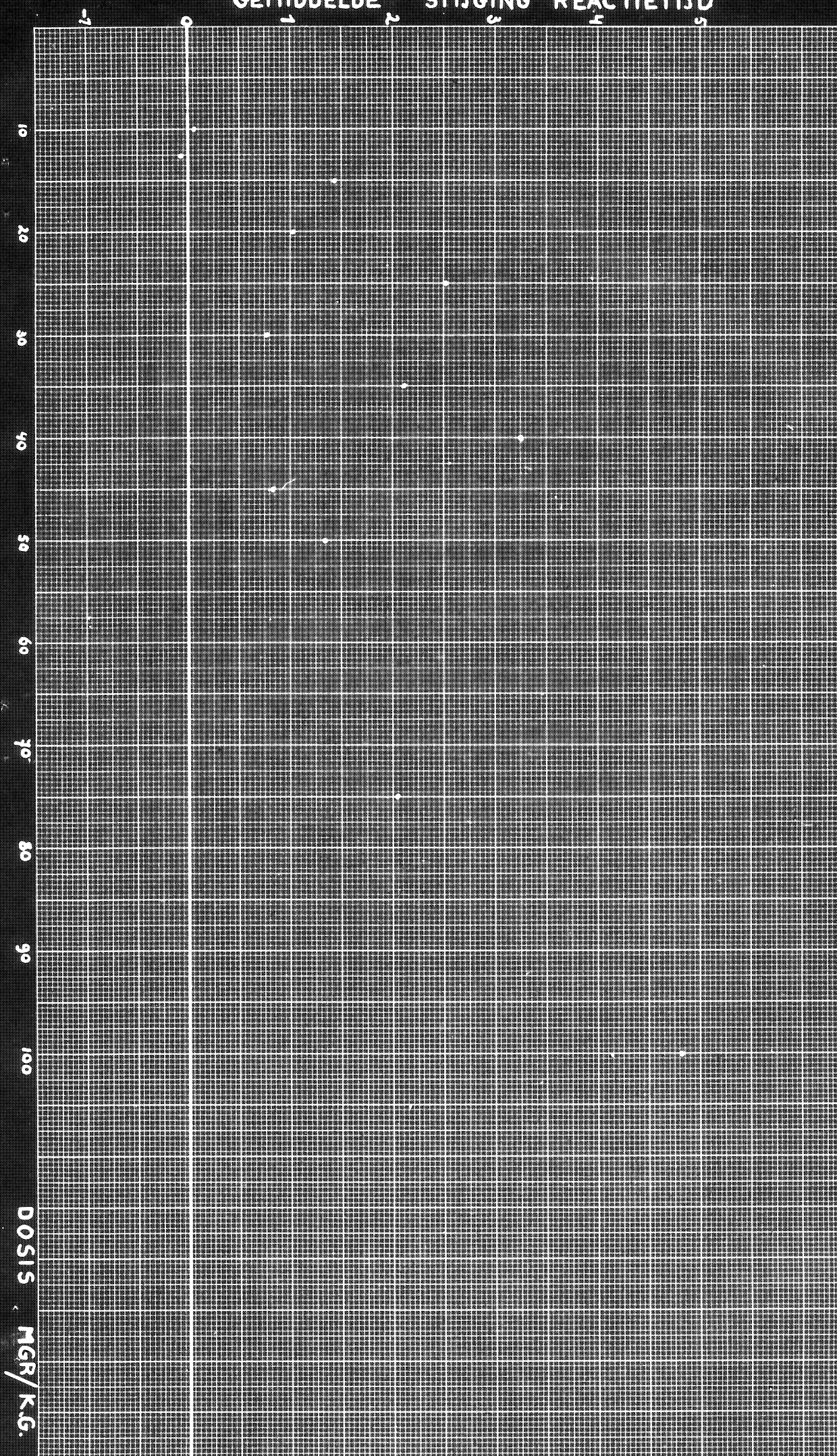
2^e De groepen gebruikte proefdieren waren slechts klein, (in de meeste gevallen 10 ratten). Bij grotere groepen zouden de gevonden effecten in de meeste gevallen al bij lagere doses aan het licht zijn gekomen, terwijl wellicht ook voor die gebieden, waarbij geen totaal achterwege blijven van de reactie optreedt, een betere aanwijzing omtrent het verband tussen dosis en effect verkregen zou kunnen worden.

SEC.

FIG. 5d

KININE
INTRAPERITONEAL

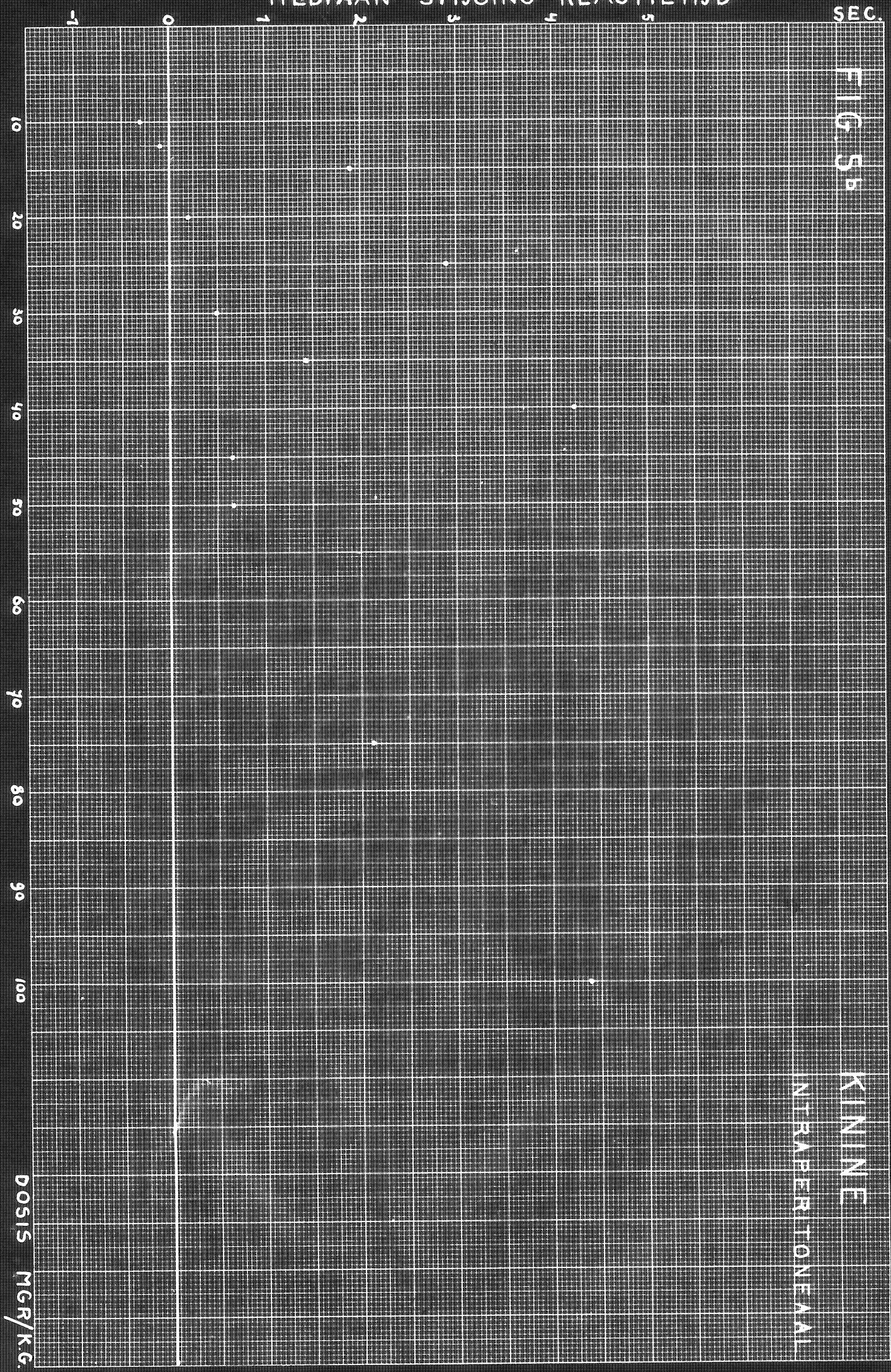
GEMIDDELDE STIJGING REACTIETIJD



DOSIS mg/kg.

FIG. 5^a

KININE
INTRAPERITONEAL



GEMIDDELDE STIJGING REACTIETIJD

SEC.

FIG. 5.

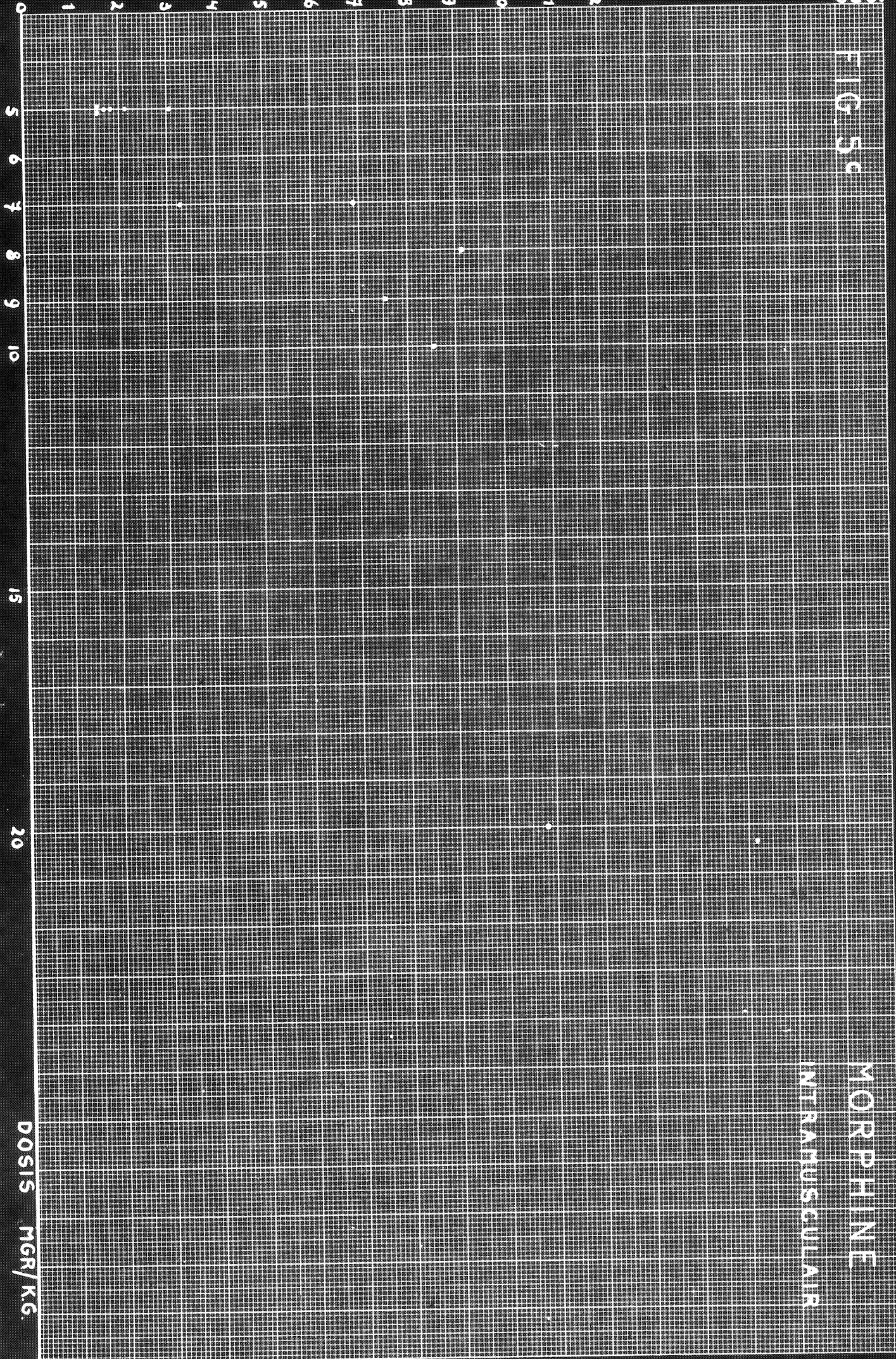
MORPHINE
INTRAMUSCULAIR

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

15

20

DOSIS mgr/kg.

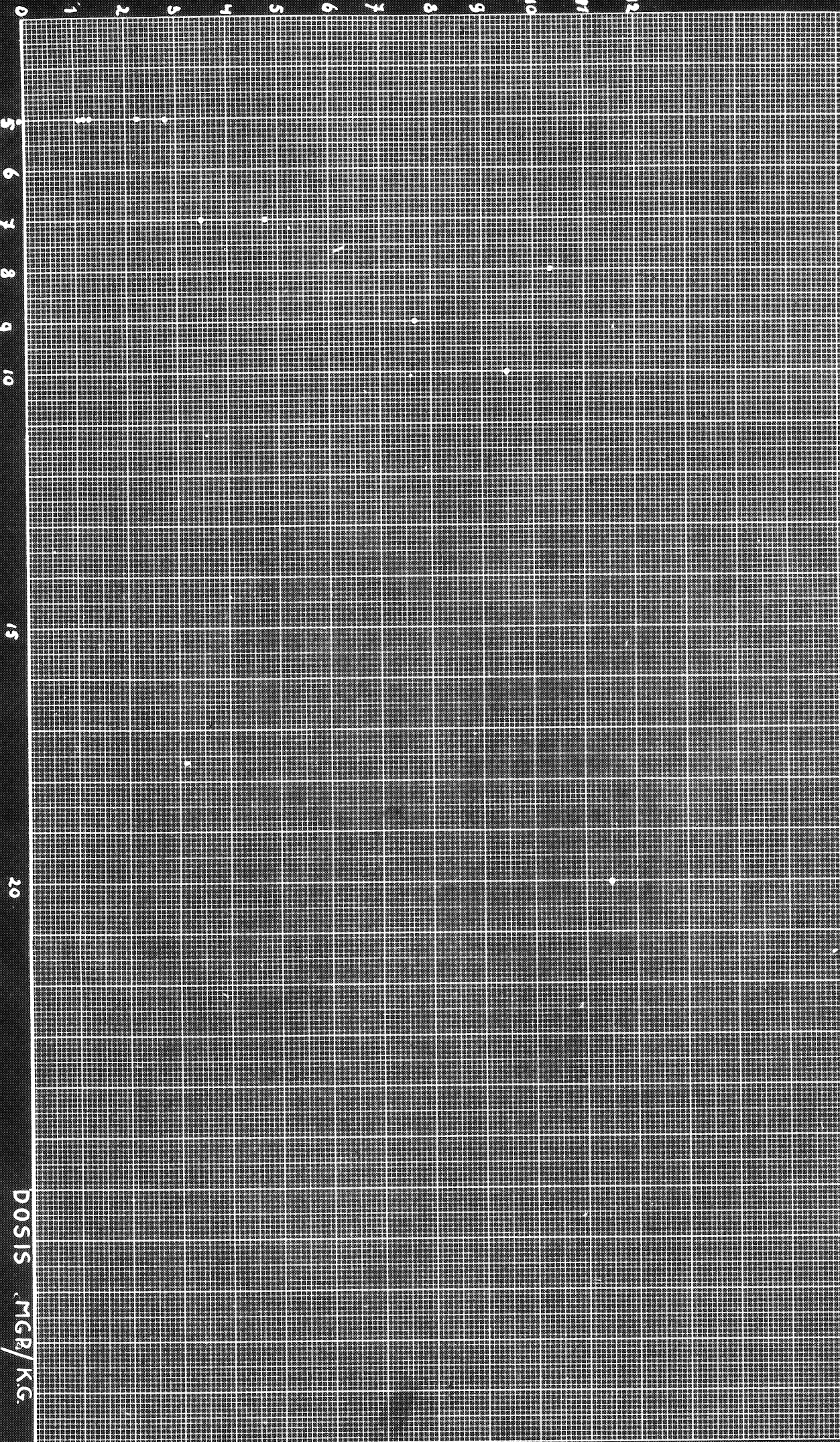


SEC.

FIG. 54

MORPHINE
INTRAMUSCULAIR

MEDIAAN STIJGING REACTIETIJD



DOSIS MGR/KG.

SEC.

FIG 5c

SYMORON

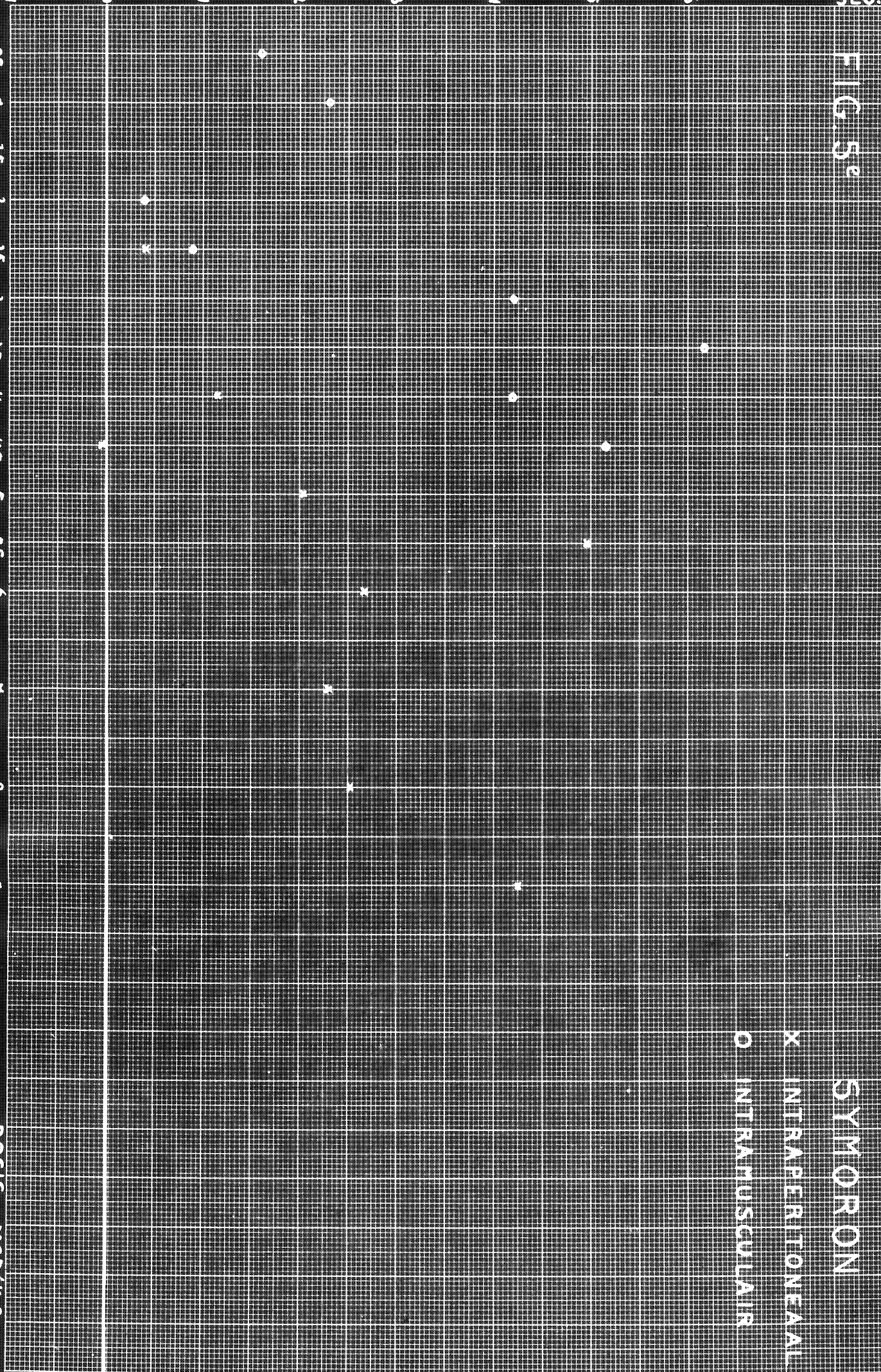
X INTRAPERITONEAL

O INTRAMUSCULAIR

GEMIDDELDE STIJGING REACTIETIJD

0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 7 8 9

DOSES MG/K.G.



SEC.

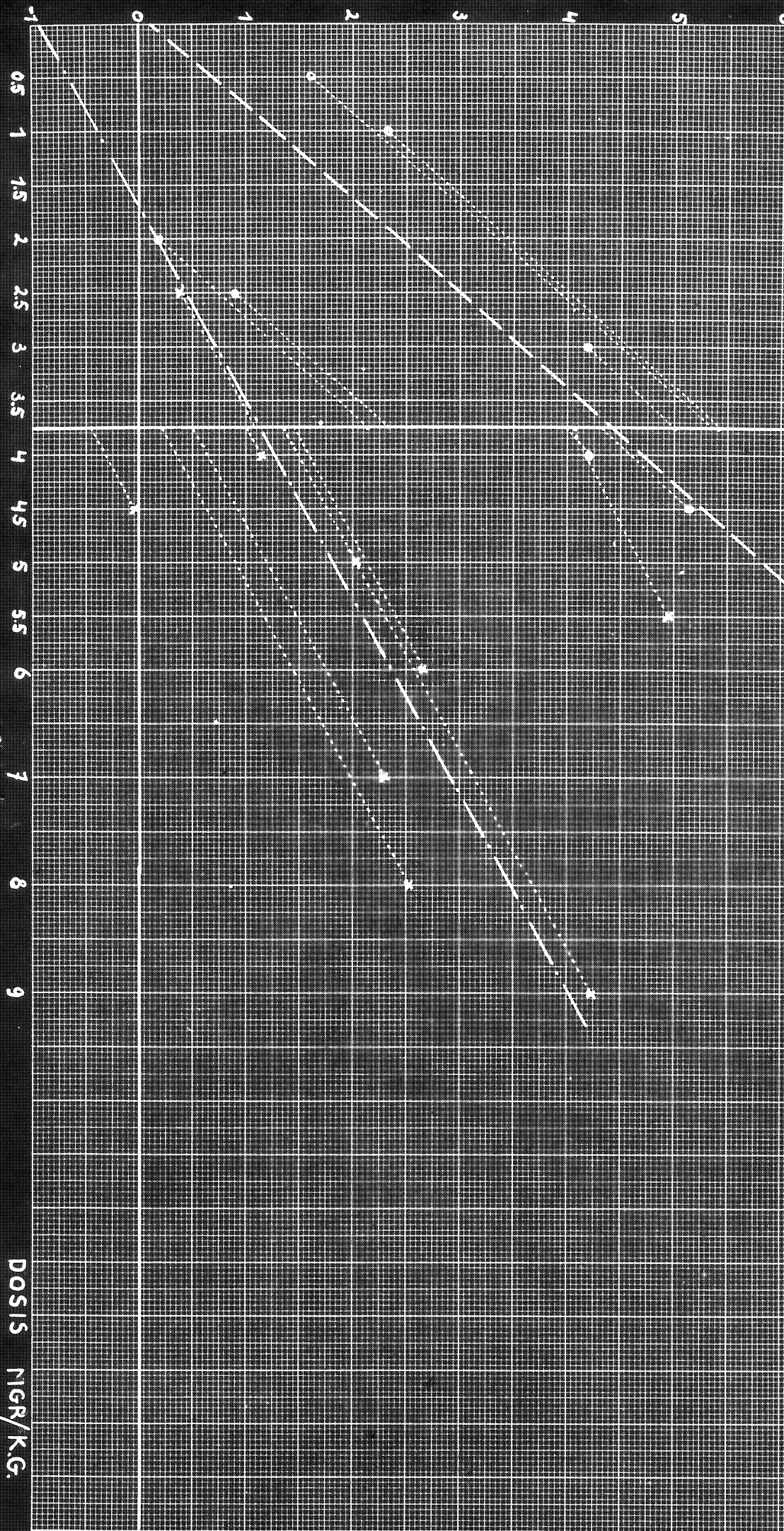
FIG. 5

SYMORON

X INTRAPERITONEAL

O INTRAMUSCULAIR

GEMIDDELDE STIJGING REACTIETIJD



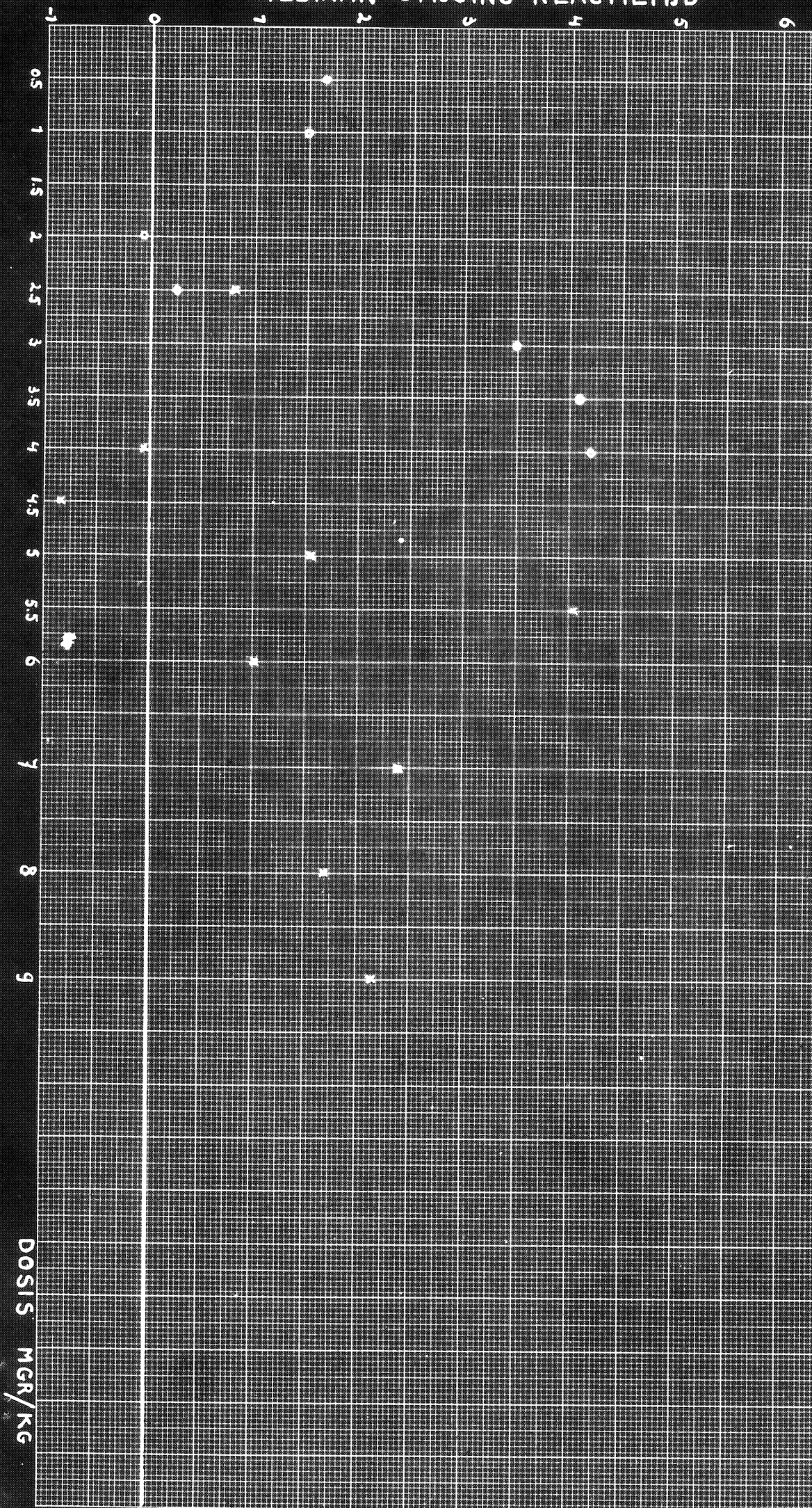
DOSIS mg/KG.

SEC.

FIG. 5'

MEDIAAN STIJGING REACTIETIJD

SYMORON
X INTRAPERITONEAL
O INTRAMUSCULAIR



DOSIS mgr/kg

SEC.

FIG. 5

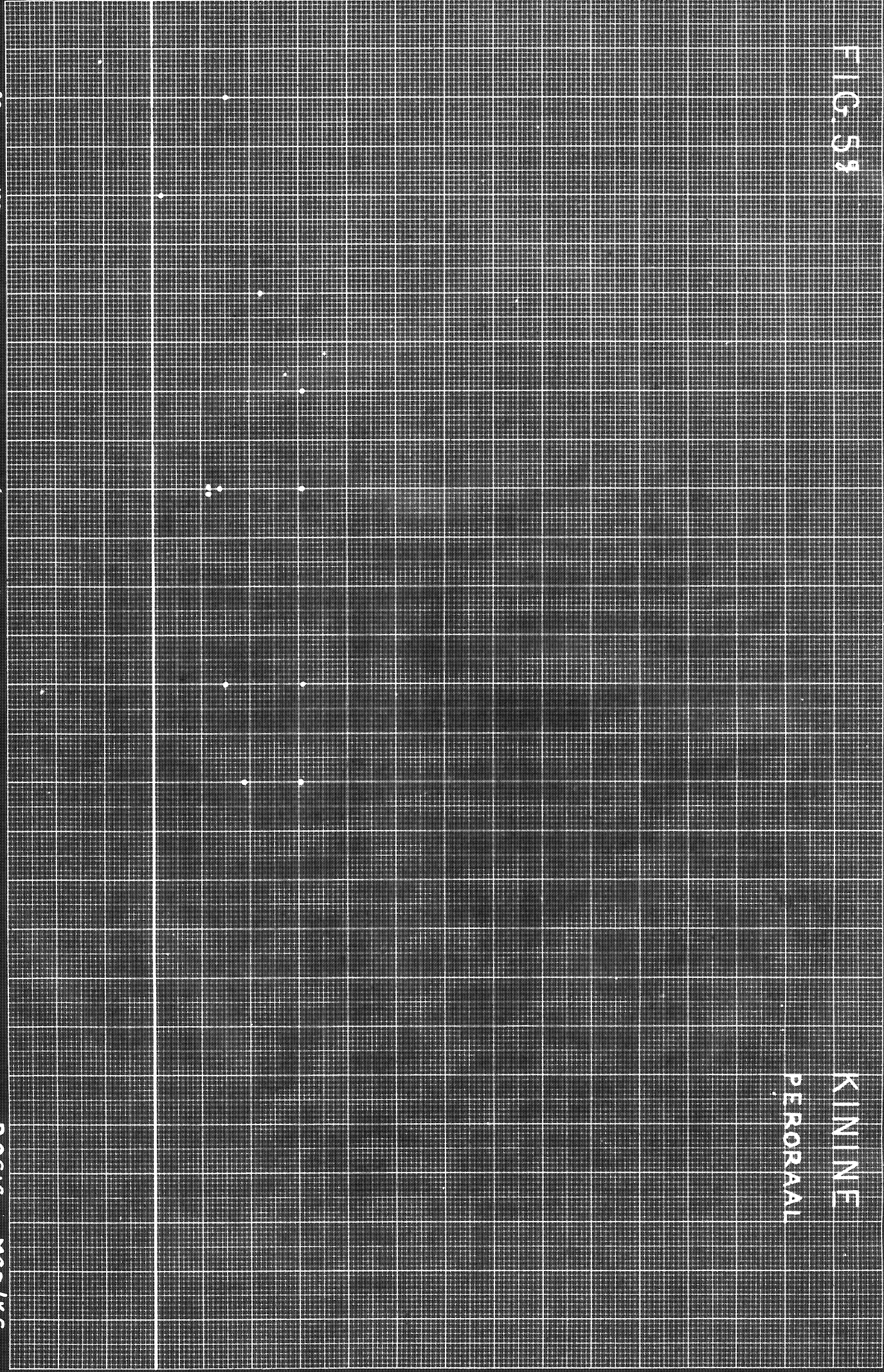
KININE

PERORAL

GEMIDDELDE STIJGING REACTIETIJD

80
100
120
140
160
180
200
220

DOSIS
MGR/KG



SEC.

FIG. 5h

KININE
PERORAL

MEDIAAN STIJGING REACTIETIJD

DO SIS MGR/K.G.

