

Dostępność biologiczna antypiryny u cieląt w pierwszych dwóch miesiącach życia

JOLANTA ANTOSZEK, KRZYSZTOF JANUS, ZBIGNIEW MUSZCZYŃSKI*

Zakład Chemii Fizjologicznej oraz *Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judyma 26, 71-466 Szczecin

Antoszek J., Janus K., Muszczyński Z.

Bioavailability of antipyrine in calves during the first two months of life

Summary

The aim of this study was to determine bioavailability and plasma protein binding of antipyrine in calves during the first two months of life.

The experiment was carried out on 20 bull calves of black and white breed. Pharmacokinetics of antipyrine in plasma and saliva was studied after intravenous and „per os” administration. Antipyrine was administered at a dose of 1000 mg on day 10, 20, 40, and 60 of the calves life. Pharmacokinetics of antipyrine was calculated according to a one-compartment open model.

A maximum concentration of antipyrine in plasma and saliva was observed in 180 min. (10 day-old calves) and 120 min. (60 day-old calves) after „per os” drug administration. Bioavailability of antipyrine in calves after „per os” administration amounted between 0.95 and 0.99 l/l. The „first pass” phenomenon was very small (0.01-0.051/1). It was proved that in examined calves the antipyrine-protein bound fraction did not exceed 3.5% of total drug concentration in the plasma (maximum – 3.2% in 10 day-old calves; minimum 1.6% in 60 day-old calves).

The results of this study (bioavailability of antipyrine \approx 100%; antipyrine – protein bound fraction < 3.5%) indicate the possibility to work out a „non-invasive” variant of antipyrine tests permitting an indirect „in ovo” determination of mixed function oxidase linked to cytochrome P-450 activity (MFO-P-450) in calves during the first months of life.

Keywords: antipyrine, calves.

Antypiryna jest modelowym lekiem stosowanym powszechnie do pośredniej oceny w warunkach *in vivo* aktywności enzymów jednego z najważniejszych szlaków metabolicznych wątroby, a mianowicie monooksygenaz mikrosomalnych (MFO – mixed function oxydase), zależnych od cytochromu P-450 (MFO-P-450). Antypiryna jest metabolizowana prawie wyłącznie w wątrobie (2, 17, 30, 34), wiąże się w bardzo niewielkim stopniu z białkami osoczwymi i tkankowymi (5, 21, 22), jej klirens wątrobowy jest praktycznie niezależny od zmian przepływu krwi przez wątrobę i czynności nerek (2, 15, 34), ulega równomiernej dystrybucji we wszystkich płynach biologicznych i nie podlega magazynowaniu tkankowemu (21, 22, 24, 30). Do niedawna wykorzystanie antypiryny jako substancji modelowej ograniczało się do ludzi i zwierząt laboratoryjnych (6, 8, 9, 17, 21-23, 30, 34). W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących farmakokinetyki antypiryny u zwierząt gospodarskich (1, 2, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 33).

Celem badań było określenie dostępności biologicznej antypiryny po podaniu *per os* oraz jej wiązania z białkami osocza u cieląt w pierwszych dwóch miesiącach życia. Badań takich u zwierząt gospodarskich do tej pory

nie prowadzono, a mogą mieć one istotne znaczenie dla opracowania nieinwazyjnego testu antypirynowego, pozwalającego ocenić w warunkach *in vivo* aktywność enzymów układu MFO-P-450, a polegającego na podaniu substancji testowej *per os* i określaniu zmian jej stężenia w ślinie.

Materiał i metody

Material. Doświadczenie przeprowadzono na 20 klinicznie zdrowych cielętach rasy czarno-białej. W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta utrzymywane były w ujednoliconych warunkach środowiskowych i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami. Cielęta podzielono losowo (metodą randomizacji) na 2 grupy, liczące po 10 osobników. Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta poddano zabiegowi kateteryzacji żyły szyjnej zewnętrznej. Zabieg ten umożliwił pobieranie próbek krwi w krótkich odstępach czasu. W trakcie trwania badań cielęta nie otrzymywały żadnych preparatów mogących wchodzić w interakcję farmakokinetyczną i biochemiczną z antypiryną.

Test antypirynowy. Cielętom z grupy I podano w 10, 20, 40 i 60 dniu życia 1000 mg antypiryny w postaci jednorazowej iniekcji dożylniej (jako tzw. bolus), w formie 10% sterylnego roztworu. Cielętom z grupy II podano w 10, 20, 40 i 60 dniu życia 1000 mg antypiryny *in substantia*, *per os* w opłat-

ku. Próby krwi i śliny do analiz pobierano przed (0) oraz po upływie 0,5; 1, 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 18 i 24 godzin od podania substancji testowej.

Krew pobierano do próbek z heparyną, a następnie odwirowywano w celu uzyskania osocza. Ślinę kolekcjonowano zgodnie z procedurą opisaną przez Janusa i wsp. (18). Zebraną ślinę odwirowywano w celu osadzenia mukopolisacharydów. Do czasu przeprowadzenia analiz próby przechowywano w temperaturze -20°C .

Stężenie antypiryny w osoczu krwi i ślinie oznaczono metodą spektrofotometryczną (4). Oznaczenia wykonano na spektrofotometrze „Marcel”, przy długości fali 350 nm. Precyzja metody w naszym laboratorium wynosi $\pm 5\%$.

Obliczenia farmakokinetyczne. Farmakokinetykę antypiryny określono, zarówno w oparciu o wyniki badań własnych (18, 19), jak i dane piśmiennictwa (10, 11, 14, 16, 17) według modelu jednokompartimentowego otwartego. Wielkość pola powierzchni pod krzywą eliminacji antypiryny (AUC – Area Under Curve), ekstrapolowaną w zakresie $0 \rightarrow \infty$, obliczono metodą trapezów (9). Stopień wiązania antypiryny przez białka osocza wyliczono zgodnie z wzorem: $f_B = 1 - V_{do}/V_{ds}$, gdzie: f_B – wielkość frakcji antypiryna-białka osocza; V_{do} – objętość dystrybucji antypiryny określana na podstawie zmian stężenia tej substancji w osoczu; V_{ds} – objętość dystrybucji antypiryny określana na podstawie zmian stężenia tej substancji w ślinie.

Dostępność biologiczną antypiryny (F) po podaniu *per os*, obliczono zgodnie z wzorem: $F = \text{AUCp.o.}/\text{AUCi.v.}$, gdzie: AUCp.o. = pole powierzchni pod krzywą po podaniu antypiryny *per os*; AUCi.v. = pole powierzchni pod krzywą po podaniu antypiryny dożylnie. Wielkość F wyliczono zarówno w oparciu o pomiar stężenia antypiryny w osoczu i w ślinie.

Efekt pierwszego przejścia (f_m) obliczono według wzoru: $f_m = 1 - F$, gdzie: f_m – efekt pierwszego przejścia w czasie 24-godzinnej rejestracji stężeń antypiryny w osoczu lub ślinie; F – dostępność biologiczna antypiryny.

Obliczenia statystyczne. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą testu wielokrotnego rozstępu Dun-cana (Statgraphics 5.0).

Wyniki i omówienie

Dostępność biologiczna antypiryny po podaniu *per os* była u badanych cieląt bardzo wysoka. Wielkości F obliczone na podstawie zmian stężenia antypiryny zarówno w osoczu, jak i ślinie wahały się w granicach 0,95-0,99 1/1 (tab. 1). Analiza uzyskanych wyników nie wykazała zależności między dostępnością biologiczną antypiryny a wiekiem badanych zwierząt (wartości obserwowane u cieląt 10, 20, 40 i 60 dniowych nie różniły się istotnie).

Wielkość efektu pierwszego przejścia dla antypiryny okazała się u cieląt między 10 a 60 dniem życia znikoma. Wartości f_m wahały się w granicach 0,01-0,05 1/1 (tab. 1). Podobnie jak w przypadku dostępności biologicznej antypiryny, nie udało się wykazać zależności między wielkością efektu pierwszego przejścia tej substancji modelowej a wiekiem badanych zwierząt.

Stopień wiązania antypiryny z białkami osocza u cieląt w wieku od 10 do 60 dni był bardzo niewielki. Wielkość frakcji związanej z białkami osocza (f_B) wahała się w granicach 1,6-3,2% (tab. 1), przy czym wartości f_B obserwowane u cieląt 10, 20 i 40 dniowych były istotnie

Tab. 1. Wielkość badanych parametrów farmakokinetycznych antypiryny u cieląt między 10 a 60 dniem życia ($\bar{x} \pm s$)

Parametry farmakokinetyczne	Dzień życia			
	10	20	40	60
F (1/1)*	0,96 0,03	0,97 0,03	0,95 0,02	0,99 0,04
F (1/1)**	0,97 0,02	0,98 0,03	0,96 0,04	0,98 0,05
F _m (1/1)*	0,04 0,002	0,03 0,002	0,05 0,004	0,01 0,001
F _m (1/1)**	0,03 0,002	0,02 0,001	0,04 0,003	0,02 0,004
F _B (%)	3,2	2,8	2,5	1,6
T _{max} (min)	180 17	150 15	120 11	120 10

Objaśnienia: objaśnienia symboli F, F_m, F_B, T_{max} znajdują się w rozdziale materiał i metody; *wielkości wyliczone na podstawie stężeń antypiryny w osoczu; **wielkości wyliczone na podstawie stężeń antypiryny w ślinie.

($P < 0,01$) wyższe (2,5-3,2%) w porównaniu do wartości stwierdzonych u cieląt 60 dniowych (1,6%).

Szybkość wchłaniania antypiryny z przewodu pokarmowego ulegała istotnemu ($P < 0,01$) zwiększeniu wraz z wiekiem badanych cieląt. U zwierząt 10-dniowych wynosiła ona 180 minut, u 20-dniowych – 150 minut, natomiast u 40 i 60-dniowych – 120 minut (tab. 1).

Wyniki badań wykazały, że podana *per os* antypiryna jest szybko wchłaniana z przewodu pokarmowego cieląt. U zwierząt 10-dniowych czas osiągnięcia stężenia maksymalnego antypiryny w osoczu i ślinie wynosił średnio 180 minut, natomiast u cieląt 60-dniowych, średnio 120 minut. Zbliżoną szybkość absorpcji antypiryny z przewodu pokarmowego zaobserwowali u ludzi Vital-Durand i wsp., (31) oraz Welch i wsp. (32).

Ogólnie wiadomo, że dożylnie wstrzyknięta dawka leku dostaje się od razu i w całości do krążenia, w związku z czym jego dostępność biologiczna wynosi 100%. Pojawienie się leku we krwi po jego pozanaczyniowym podaniu musi poprzedzić jego absorpcja, stwarzająca wiele możliwości zmniejszenia dostępności biologicznej (13, 20, 26). Ma to szczególne znaczenie w przypadku podawania środków farmakologicznych *per os*. Niecałkowite uwalnianie leku (np. z kapsulek) i jego niepełna rozpuszczalność powoduje częściowe wydalanie leku (w formie niezmięnionej) wraz z kałem (8, 13). Środki farmakologiczne mogą ulegać także biotransformacji w świetle przewodu pokarmowego i jego ścianach pod wpływem enzymów (głównie monoooksygenaz) i flory bakteryjnej (3). Następną przyczyną zmniejszenia dostępności biologicznej leku po podaniu *per os* jest tzw. efekt pierwszego przejścia, tzn. biotransformacja leku

w wątrobie przed jego przejściem do krążenia ogólnoustrojowego (3, 26). Jest to z reguły najważniejszy czynnik zmniejszający dostępność biologiczną środków farmakologicznych podawanych doustnie (3, 13).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż dostępność biologiczna (F) antypiryny po podaniu 1000 mg *in substantia* w opłatku waha się w granicach 0,95-0,99 1/1, co wskazuje na praktycznie całkowitą absorpcję tej substancji z przewodu pokarmowego badanych cieląt. Zbliżoną dostępność biologiczną antypiryny stwierdzili (u ludzi) Loft (22), Loft i wsp. (23) oraz Welch i wsp. (32). Danhof i wsp., (8) podając antypirynę doustnie w roztworze wodnym oraz w kapsułkach żelatynowych zaobserwowali, że o ile w pierwszym przypadku dostępność biologiczna jest praktycznie zawsze bardzo zbliżona do 1 ($1,05 \pm 0,11$), to w przypadku stosowania kapsułek, absorpcja antypiryny z przewodu pokarmowego może być nie zawsze kompletna ($F < 0,9$). Odmienne zdanie prezentują w swych publikacjach Vital-Durand i wsp. (31) oraz Welch i wsp. (32). Wykazali oni, że w przypadku podawania antypiryny w kapsułkach żelatynowych jej dostępność biologiczna jest praktycznie w każdym przypadku (z wyjątkiem stanów patologicznych przewodu pokarmowego) całkowita ($F \approx 1$). Danhof i wsp. (8) stwierdzili natomiast, że podczas biegunek (o różnej etiologii), także wchłanianie antypiryny z roztworów wodnych jest niekompletne.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że współczynnik dystrybucji antypiryny między osoczem a śliną jest bardzo zbliżony do jedności i waha się w granicach 0,968-0,984. Podobne wyniki uzyskali (u ludzi) inni autorzy (20, 23, 28). Wykazano także, iż stosunek stężeń antypiryny osocze/ślina nie jest zależny od wielkości wytwarzania śliny (28) i drogi wprowadzenia antypiryny do organizmu (31). W przypadku podania antypiryny w roztworze wodnym, koncentracja tej substancji w ślinie nie jest odbiciem jej stężenia w osoczu w ciągu pierwszej godziny po wprowadzeniu do organizmu (32). Svensson (28) oraz Vital-Durand i wsp. (31) twierdzą, w związku z retencją antypiryny w śluzówce jamy ustnej po podaniu w roztworze wodnym, że podanie tej substancji w opłatku lub kapsułkach żelatynowych pozwala na bardziej precyzyjne oddzielenie fazy absorpcji od fazy eliminacji. Wyniki innych badań (Janus i wsp., 1994 – dane niepublikowane) potwierdzają tę sugestię.

Stwierdzony w doświadczeniu stopień wiązania antypiryny z białkami osocza (f_b) kształtował się na poziomie 1,6-3,2% aktualnego stężenia tej substancji w osoczu. Wskazuje to na bardzo niewielkie wiązanie antypiryny przez białka osoczowe. Jak wiadomo (20, 23, 27, 29) stężenie danej substancji farmakologicznej w osoczu odpowiada sumie frakcji wolnej i związanej. W ślinie obecna jest tylko frakcja wolna (25, 27, 29). Opierając się na założeniu, że środki farmakologiczne przenikają do śliny na drodze biernej dyfuzji (12, 20) można wnioskować, że stopień ich wiązania z białkami osocza jest pochodną różnicy między objętościami dystrybucji obliczonymi dla osocza (V_{do}) i śliny (V_{ds}): im większa jest frakcja związana, tym mniejsza V_{do} w porównaniu

do V_{ds} . Należy podkreślić, że proces wiązania leków z białkami wykazuje odrębności gatunkowe. Wykazano np., iż u cieląt w okresie neonatalnym stopień wiązania gentamycyny z albuminami ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem, mimo, że koncentracja tych białek w osoczu istotnie rośnie (7). Także u prosiąt obserwowano istotne zmniejszenie się stopnia wiązania trimetoprimu z białkami, przy jednoczesnym istotnym zwiększeniu koncentracji albumin w surowicy (3). Wyniki wielu badań wskazują na preferencyjne wiązanie albumin z cząsteczkami niektórych leków w okresie neonatalnym, co z kolei może rzutować na ich odmienną dystrybucję oraz „przesunięcie” w obrębie frakcji wolnej i związanej (3, 7, 26).

Podsumowując uzyskane w niniejszym doświadczeniu wyniki można stwierdzić, że u cieląt w pierwszych dwóch miesiącach życia obserwuje się bardzo wysoką (zbliżoną do 100%) dostępność biologiczną antypiryny po podaniu *per os*, znikomy efekt pierwszego przejścia oraz bardzo niewielkie wiązanie tej substancji modelowej z białkami osocza. Wskazuje to na możliwość opracowania nieinwazyjnego testu antypirynowego służącego do pośredniej oceny aktywności monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 u cieląt w warunkach *in vivo*.

Piśmiennictwo

1. Ali B. H., Elsheikh H. A.: Eur. J. Pharmacol. 183, 1846, 1990.
2. Ben-Zvi Z., Rubin M., Van Crevold C., Yagil R.: J. Vet. Pharmacol. Ther. 18, 137, 1995.
3. Besunder J. B., Redd M. D., Blumer J. L.: Clin. Pharmacokinet. 14, 189, 1988.
4. Brodie B. B., Axelrod J., Soberman R., Levy B.: J. Biol. Chem. 179, 25, 1949.
5. Brunner L. J., Di Piro J. T., Feldman S.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 345, 1995.
6. Cheung N. W., Liddle C., Coverdale S., Lou J. C., Boyages S. C.: J. clin. Endocrinol. Metab. 81, 1999, 1996.
7. Clarke C. R., Short C. R., Ruei-Ching H., Baggot J. D.: Am. J. Vet. Res. 46, 2461, 1985.
8. Danhof M., Zuilen A. van, Boeijinga J. K., Breimer D. D.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 21, 433, 1982.
9. Danhof M., Breimer D. D.: Br. J. Clin. Pharmacol. 18, 529, 1989.
10. Depelchin B. O., Bloden S., Ansay M.: J. Vet. Pharmacol. Ther. 10, 49, 1987.
11. Depelchin B. O., Bloden S., Michaux C., Ansay M.: Res. Vet. Sci. 44, 135, 1988.
12. Drobitch R., Svensson C.: Clin. Pharmacokinet. 23, 365, 1992.
13. Edeki T., Turner P.: Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 33, 70, 1995.
14. Elsheikh H. A., Ali B. H., Homeida A. M., Hassan T., Hapke H. J.: J. Vet. Pharmacol. Ther. 14, 269, 1996.
15. Engel G., Hofmann U., Heidemann H., Cosme J., Eichelbaum M.: Clin. Pharmacol. Ther. 59, 613, 1996.
16. Ferré L., Lopez P., Rojo-Vasquez F. A., Gonzalez-Gallego J.: Vet. Parasitol. 62, 93, 1996.
17. Gawrońska-Szklarz B., Drożdżik M., Kwiatkowski A., Wójcicki J.: Ginek. Pol. 67, 1, 1996.
18. Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D.: Arch. Vet. Pol. 31, 65, 1991.
19. Janus K., Muszczyński Z., Skrzypczak W. F.: Acta Vet. (Brno) 65, 123, 1996.
20. Jorquera F., Almar M. M., Jimeno A., Gonzalez-Sastre M., Gonzalez-Gallego J.: J. Pharm. Biomed. Anal. 13, 1141, 1995.
21. König P. K., Cantilena L.: Arch. Int. Med. 154, 590, 1994.
22. Loft S.: Pharmacol. Toxicol. 66, (supl. 6), 1, 1990.
23. Loft S., Nielsen A. J., Borg B. E., Poulsen H. E.: Xenobiotica, 21, 33, 1991.
24. Monshouwer M., Witkamp R. F., Nijmeijer S. M., Pijpers A., Verheijden J., Van Miert A. S.: Xenobiotica, 25, 491, 1995.
25. Mucklow J. C.: Ther. Drug Monit. 4, 229, 1992.
26. Schneide M., Thomas V., Boisrame B., Deforge J.: J. Vet. Pharmacol. Ther. 19, 56, 1996.
27. Steinborn B., Galas-Zgorzalewicz B.: Probl. Ter. Monit. 6, 60, 1995.
28. Svensson C. K.: Clin. Pharmacol. Ther. 44, 365, 1988.
29. Szymura-Oleksiak J.: Probl. Ter. Monit. 4, 3, 1993.
30. Viktorov A. P., Rybak A. T.: Farmakol. Toksikol. 53, 74, 1990.
31. Vital-Durand D., Piolat C., Soucheleau J., Baltassat P., Brazier J. L.: Therapie 43, 263, 1988.
32. Welch R. M., De Angelis R. L., Wingfield M., Farmer T. W.: Clin. Pharmacol. Ther. 49, 249, 1995.
33. Witkamp R. F., Nijmeijer S. M., Kolker H. J., Noordhoek J., Van Miert A. S.: J. Vet. Pharmacol. Ther. 16, 164, 1993.
34. Zavadnik L. B., Lukjenko P. I., Busma M. I.: Farmakol. Toksikol. 52, 95, 1989.

Adres autora: dr Jolanta Antoszek, ul. Chopina 51/411, 71-451 Szczecin