

# Próba oceny biotransformacyjnej aktywności wątroby u cieląt przy pomocy uproszczonego testu paracetamolowego<sup>\*)</sup>

BEATA GROCHOWINA, KRZYSZTOF JANUS

Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 2, 71-466 Szczecin

Grochowina B., Janus K.

## Trials to evaluate the biotransformation activity of the liver in calves using a simplified paracetamol test

### Summary

The aim of the investigation was the modification of the paracetamol (as a model drug) test for calves. We examined if a precise determination of the pharmacokinetics of paracetamol (indirectly the activity of enzymes catalyzing the reaction of phase II of hepatic biotransformation) was possible using a simplified paracetamol test. The experiment was carried out on 15 healthy calves of BW (Black-and-White) breed. Paracetamol (5 mg/kg bw.) was administered per os on the tenth, twentieth and fourteenth days of the calves' lives. The concentration of a model drug in plasma was determined by the spectrophotometric method in 10, as well as 3 and 4 samples. Pharmacokinetic parameters were estimated using a non-compartmental method, via the TopFit computer program. The values of pharmacokinetic parameters of paracetamol estimated in "simplified variants" significantly correlated ( $r = 0.874-0.985$ ) with data obtained in a full test. The highest coefficients of the correlation was observed when the concentration of paracetamol was determined at 3, 4, 6 and 8 hours after the model drug administration. Summing up, it was determined that it is possible to evaluate precisely and indirectly the biotransformation activity in calves (activity of UDP-glucuronyltransferase and sulfonyltransferase) using a simplified variant of paracetamol test, based on the determination of the concentration of the model drug in 3-4 blood samples.

**Keywords:** paracetamol, pharmacokinetics, hepatic biotransformation, calves

Do pośredniej oceny aktywności enzymów katalizujących reakcje biotransformacji wątrobowej coraz częściej wykorzystuje się tzw. leki modelowe. Na podstawie ich farmakokinetyki można określić wydolność metaboliczną układów enzymatycznych uczestniczących w poszczególnych fazach biotransformacji w hepatocytach. Do leków pozwalających ocenić szybkość reakcji I fazy biotransformacji zalicza się m.in. antypirynę i kofeinę (4, 7-9, 14, 15, 17).

Paracetamol oprócz zastosowania terapeutycznego jest stosowany również w badaniach farmakokinetycznych jako lek modelowy (marker) służący do badania czynników wpływających na aktywność enzymów uczestniczących w procesach II fazy biotransformacji wątrobowej (1-4, 10, 13, 16).

Ze względu na mechanizm eliminacji paracetamol należy do tzw. pierwszej grupy leków, co oznacza, iż jego eliminacja zależy głównie od wydolności metabolicznej komórek wątroby, nie zależy natomiast od przepływu wątrobowego ani od związania z białkami (1, 4, 10, 16). Leki tej grupy charakteryzują się niskim klirensiem

wewnętrznym, małym współczynnikiem ekstrakcji i niewielkim stopniem wiązania z białkami (4, 10, 16). Są one wolniej eliminowane, gdy zmniejsza się wydolność metaboliczna wątroby (4, 10, 18).

Klasyczny test paracetamolowy polega na podaniu (dożylnym lub *per os*) określonej ilości tego leku i oznaczeniu jego stężenia we krwi pobranej w określonych przedziałach czasowych (4, 5, 10, 15, 16). Z reguły podczas wykonywania testu pobiera się od 10 do 12 próbek krwi.

Od wielu lat podejmowane są próby opracowania uproszczonych wariantów testów pozwalających na pośrednią ocenę aktywności enzymów katalizujących procesy biotransformacji wątrobowej w oparciu o oznaczanie stężenia leków modelowych w niewielkiej ilości próbek materiału biologicznego (5, 7, 14, 16). Pozytywne wyniki uzyskano do tej pory w odniesieniu do antypiryny (7, 14, 20, 21) i kofeiny (9, 17).

Celem przeprowadzonych badań było stwierdzenie, czy możliwe jest precyzyjne określenie farmakokinetyki paracetamolu u cieląt przy pomocy uproszczonego wariantu testu paracetamolowego polegającego na znaczącym ograniczeniu ilości pobieranych prób materiału biologicznego (krwi) wykorzystywanego do analiz.

<sup>\*)</sup> Praca wykonana w ramach grantu 3 P06D 016 24 finansowanego przez KBN.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 15 cielętach rasy czarno-białej w 10., 20. i 40. dniu życia. W czasie trwania eksperymentu zwierzęta były utrzymywane w ujednoliconych warunkach środowiskowych i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami.

W trakcie trwania badań cielęta nie otrzymywały żadnych środków farmakologicznych mogących wchodzić w interakcję farmakokinetyczną i biochemiczną z paracetamolem.

Protokół badań został zaakceptowany przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (zezwoleń 31/2002).

Paracetamol (Codipar Glaxo-Wellcome, Poznań) podawano *per os* w dawce 5 mg/kg m.c. Krew (około 5 ml) pobierano do próbek zawierających 250 j.m. heparyny (Heparinum-Jelfa) przed 0 oraz po upływie 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 godzin od podania substancji testowej. Krew wirowano (4000 g, 15 min.). Uzyskane po odwirowaniu osocze przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu przeprowadzenia analiz. Stężenie paracetamolu w osoczu krwi oznaczono metodą spektrofotometryczną (19). Średni „odzysk” paracetamolu z osocza wyniósł  $95,8 \pm 2,9\%$ . Czułość metody wyniosła  $0,20 \mu\text{g/ml}$ . Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu oznaczono metodą niekompartmentową przy wykorzystaniu programu TopFit 2,0. Wyliczone następujące parametry farmakokinetyczne: objętość dystrybucji –  $V_d$  (l/kg); średni czas przebywania w organizmie – MRT (min.); klirens metaboliczny –  $Cl_m$  (ml/min./kg):

– we wszystkich pobranych próbkach krwi (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 godzin od podania substancji testowej) – wariant „pełny” (A);

– w próbkach pobranych po upływie 2, 3, 4, 6 godzin od podania paracetamolu – wariant (B);

– w próbkach pobranych po upływie 2, 4, 6, 8 godzin od podania paracetamolu – wariant (C);

– w próbkach pobranych po upływie 3, 4, 6, 8 godzin od podania paracetamolu – wariant (D);

– w próbkach pobranych po upływie 2, 3, 4, 8 godzin od podania paracetamolu – wariant (E);

– w próbkach pobranych po upływie 3, 6, 8 godzin od podania paracetamolu – wariant (F);

– w próbkach pobranych po upływie 4, 6, 10 godzin od podania paracetamolu – wariant (G);

– w próbkach pobranych po upływie 4, 8, 10 godzin od podania paracetamolu – wariant (H).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując program Statistica v. 6.0.

Wyliczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona ( $r$ ) między pełnym wariantem testu paracetamolowego – polegającym na oznaczaniu wielkości parametrów farmakokinetycznych leku modelowego we wszystkich pobranych próbkach materiału biologicznego (krwi) a wariantami uproszczonymi.

## Wyniki i omówienie

Interpretacja uzyskanych w niniejszym doświadczeniu wyników jest stosunkowo trudna, ze względu na istnienie znaczących różnic międzygatunkowych w farmakokinetyce paracetamolu (2-5, 10, 13, 16). Paracetamol w ponad 95% metabolizowany jest w wątrobie (2, 5, 10, 13). W hepatocytach ulega on reakcjom sprzęgania, głównie z kwasem glukuronowym przy udziale transferazy glukuronowej (UDP-glukuronylotransferazy) oraz z siarczanem (reakcja ta jest katalizowana przez sulfonilotransferazy) (2, 5, 10, 17). Około 3-4% paracetamolu ulega utlenieniu do N-acetylobenzochinoininy. Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy kompleksu cytochromu P-450 (2, 5, 6). Sprzęganie paracetamolu z siarczanem jest głównym szlakiem metabolicznym tego leku u młodych organizmów, u których w hepatocytach stwierdzono mniejszą aktywność glukuronilotransferaz (10-12).

Tab. 1. Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu u 10-dniowych cieląt oceniana na podstawie pomiaru stężeń leku modelowego w osoczu krwi w różnych punktach czasowych

Warianty testu	Parametry farmakokinetyczne		
	$V_d$ (l/kg)	MRT (min.)	$Cl_m$ (ml/min./kg)
Pełny (A)	$0,701 \pm 0,058$	$100 \pm 9$	$6,15 \pm 0,65$
(B) : $r = 0,874^{**}$	$0,679 \pm 0,055$	$91 \pm 10$	$6,61 \pm 0,72$
(C) : $r = 0,925^{**}$	$0,688 \pm 0,054$	$93 \pm 8$	$6,32 \pm 0,67$
(D) : $r = 0,960^{**}$	$0,691 \pm 0,057$	$97 \pm 9$	$6,21 \pm 0,59$
(E) : $r = 0,931^{**}$	$0,686 \pm 0,050$	$95 \pm 7$	$6,27 \pm 0,63$
(F) : $r = 0,925^{**}$	$0,682 \pm 0,051$	$94 \pm 8$	$6,30 \pm 0,48$
(G) : $r = 0,907^{**}$	$0,678 \pm 0,059$	$92 \pm 10$	$6,55 \pm 0,60$
(H) : $r = 0,881^{**}$	$0,675 \pm 0,058$	$90 \pm 8$	$6,67 \pm 0,58$

Objaśnienia: A – wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu obliczona na podstawie oznaczenia jego stężenia w osoczu we wszystkich (10) punktach czasowych; B – obliczeń dokonano na podstawie stężeń paracetamolu w osoczu w 2., 3., 4., 6. godzinie po podaniu; C – jw., z tym, że w 2., 4., 6., 8. godzinie; D – jw., z tym, że w 3., 4., 6., 8. godzinie; E – jw., z tym, że w 2., 3., 4., 8. godzinie; F – jw., z tym, że w 3., 6., 8. godzinie; G – jw., z tym, że w 4., 6., 10. godzinie; H – jw., z tym, że w 4., 8., 10. godzinie;  $r$  – współczynnik korelacji między testem wykonanym zgodnie z wariantami B, C, D, E, F, G, H a testem pełnym – A

Stwierdzone w doświadczeniu wielkości objętości dystrybucji paracetamolu są zbliżone do rezultatów badań przeprowadzonych u prosiąt (16, 17). Nieco niższe wartości obserwowano u młodych królików (15), natomiast zdecydowanie wyższe u wielbłądów (2). Średni czas przebywania paracetamolu w organizmie okazał się zbliżony do obserwowanego przez Monshouwera i wsp. (16, 17); zdecydowanie krótszy MRT stwierdzili natomiast Ali i wsp. (2) oraz McNamara i wsp. (15). Obserwowane wielkości klirensu metabolicznego paracetamolu u badanych cieląt są nieco niższe od stwierdzonych przez Monshouwera i wsp. (16, 17) oraz zdecydowanie niższe od podawanych przez Ali i wsp. (2) oraz McNamarę i wsp. (15). Należy podkreślić, że wraz z wiekiem badanych zwierząt zaobserwowano istotne zmniejszanie się względnej objętości dystrybucji, skracanie średniego czasu przebywania w organizmie oraz zwiększanie względnego klirensu metabolicznego paracetamolu. Podobne zjawisko stwierdzono u innych gatunków zwierząt (4, 10, 16, 17). Wykazane zmiany wielkości parametrów farmakokinetycznych paracetamolu (MRT i  $Cl_m$ ) świadczą pośrednio o zwiększaniu się aktywności enzymów katalizujących procesy II fazy biotransformacji wątrobowej u cieląt.

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano istnienie dodatniej, statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wielkościami wybranych parametrów farmakokinetycznych ( $V_d$ , MRT,  $Cl_m$ ) paracetamolu obliczonymi na podstawie oznaczenia stężeń tego leku modelowego w każdym analizowanym punkcie czasowym (wariant A), a wielkościami uzyskanymi przy zastosowaniu wariantów uproszczonych, polegających na obliczeniu  $V_d$ , MRT,  $Cl_m$  w oparciu o stężenie paracetamolu w 3-4 punktach czasowych (tab. 1-3). Zarówno u cieląt 10-, 20-, jak i 40-dniowych najwyższy współczynnik korelacji (z wariantem pełnym) zaobserwowano w przypadku oznaczenia stężenia leku modelowego

**Tab. 2.** Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu u 20-dniowych cieląt oceniana na podstawie pomiaru stężeń leku modelowego w osoczu krwi w różnych punktach czasowych

Warianty testu	Parametry farmakokinetyczne		
	$V_d$ (l/kg)	MRT (min.)	$Cl_m$ (ml/min./kg)
Pełny (A)	0,642 ± 0,053	105 ± 10	7,80 ± 0,68
(B) : r = 0,887**	0,672 ± 0,058	114 ± 13	7,20 ± 0,78
(C) : r = 0,936**	0,658 ± 0,052	109 ± 11	7,52 ± 0,69
(D) : r = 0,977**	0,649 ± 0,061	106 ± 8	7,75 ± 0,65
(E) : r = 0,926**	0,655 ± 0,054	112 ± 12	7,30 ± 0,59
(F) : r = 0,930**	0,660 ± 0,051	111 ± 10	7,35 ± 0,68
(G) : r = 0,918**	0,665 ± 0,059	99 ± 9	8,10 ± 0,72
(H) : r = 0,893**	0,670 ± 0,060	95 ± 7	8,25 ± 0,78

Objaśnienia: jak w tab. 1.

**Tab. 3.** Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu u 40-dniowych cieląt oceniana na podstawie pomiaru stężeń leku modelowego w osoczu krwi w różnych punktach czasowych

Warianty testu	Parametry farmakokinetyczne		
	$V_d$ (l/kg)	MRT (min.)	$Cl_m$ (ml/min./kg)
Pełny (A)	0,560 ± 0,047	75 ± 7	8,50 ± 0,74
(B) : r = 0,903**	0,546 ± 0,045	82 ± 9	7,61 ± 0,82
(C) : r = 0,945**	0,553 ± 0,049	78 ± 8	8,09 ± 0,77
(D) : r = 0,985**	0,557 ± 0,051	76 ± 5	8,40 ± 0,65
(E) : r = 0,939**	0,555 ± 0,053	80 ± 9	7,79 ± 0,73
(F) : r = 0,942**	0,556 ± 0,044	79 ± 6	7,83 ± 0,59
(G) : r = 0,923**	0,549 ± 0,051	81 ± 10	7,75 ± 0,71
(H) : r = 0,904**	0,545 ± 0,043	83 ± 7	7,52 ± 0,66

Objaśnienia: jak w tab. 1.

po upływie 3, 4, 6 i 8 godzin po podaniu *per os*. Wartości  $r$  wahały się w granicach: 0,960 – cielęta 10-dniowe; 0,985 – cielęta 40-dniowe (tab. 1-3). Najmniejsze, choć również bardzo wysokie, współczynniki korelacji stwierdzono w przypadku wykorzystania stężeń w 2., 3., 4. i 6. godzinie po podaniu paracetamolu: 0,874 u cieląt 10-dniowych i 0,903 u 40-dniowych.

Do tej pory nie prowadzono badań dotyczących możliwości zastosowania uproszczonego wariantu testu paracetamolowego u zwierząt gospodarskich. Badania takie przeprowadzono jedynie w przypadku antypiryny (7) oraz kofeiny. W przypadku antypiryny stwierdzono, że możliwa jest precyzyjna, pośrednia ocena aktywności enzymów katalizujących procesy I fazy biotransformacji wątrobowej na podstawie oznaczenia stężenia tego leku modelowego w 2-3, zamiast w 10 (jak w wariancie klasycznym) próbkach krwi (7). W niniejszych badaniach pełny wariant testu paracetamolowego był precyzyjny, ponieważ stężenie leku modelowego oznaczono w 10 punktach czasowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że oznaczenie wielkości objętości dystrybucji, średniego czasu przebywania w organizmie oraz klirensu metabolicznego paracetamolu przy pomocy uproszczonego wariantu testu jest

procedurą dokładną. Wykazano, że wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu u cieląt po podaniu *per os* może być obliczona z dużą precyzją na podstawie oznaczenia stężenia tego leku modelowego w 3-4 próbkach osocza. Jednocześnie zaobserwowano, że określenie wielkości  $V_d$ , MRT oraz  $Cl_m$  paracetamolu na podstawie w 2., 3., 4. i 6. godzinie od momentu podania tej substancji testowej wykazuje najściślejszą korelację z wynikami uzyskanymi podczas wykonywania testu pełnego.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że uproszczony test paracetamolowy, oparty na oznaczaniu stężenia tego leku modelowego w 3-4 próbkach krwi pozwala na precyzyjną, pośrednią ocenę aktywności enzymów (głównie UDP-glukuronylotransferazy i sulfonylotransferazy) katalizujących procesy II fazy biotransformacji wątrobowej.

## Piśmiennictwo

1. Adzu B., Garba M., Haruna A., Maman M., Wambebe C., Gamaniel K.: Effect of niprisan on single oral dose pharmacokinetics of paracetamol in rats. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2001, 26, 201-204.
2. Ali B. H., Cheng Z., Hadrami G., Bashir A. K., McKellar Q. A.: Comparative pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) and its sulphate and glucuronide metabolites in desert camels and goats. J. Vet. Pharmacol. Ther. 1996, 19, 238-244.
3. Babalola C. P., Oladimeji F. A., Femi-Oyewo M. N.: Pharmacokinetics and saliva secretion of paracetamol in healthy male Nigerians. West. Afr. J. Med. 2004, 23, 10-14.
4. Bailie M. B., Federowicz D. A., Dolce K., Kahn C., Mico B. A., Landi M. S.: Pharmacokinetics of acetaminophen, vancomycin and antipyrine in the Hanford miniature swine. Drug. Metab. Disp. 1997, 15, 729-730.
5. Bannwarth B., Pehourcq F., Lagrange F., Matoga M., Maury S., Palisson M., Bars M.: Single and multiple dose pharmacokinetic of acetaminophen (paracetamol). J. Rheumatol. 2001, 28, 182-184.
6. Flouvat B., Leneveu A., Fitoussi S., Delhotal-Landes B., Gendron A.: Bioequivalence study comparing a new paracetamol solution for injection and paracetamol after single intravenous infusion in healthy subjects. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 2004, 42, 50-57.
7. Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D., Jankowiak D., Skrzypczak W. F.: Próba oceny biotransformacyjnej aktywności wątroby u cieląt przy pomocy uproszczonego testu antypirynowego. Medycyna Wet. 1991, 47, 330-331.
8. Janus K., Antoszek J., Muszczyński Z.: Dostępność biologiczna antypiryny u cieląt w pierwszych dwóch miesiącach życia. Medycyna Wet. 1999, 55, 123-125.
9. Janus K., Antoszek J.: The effect of sex and age on caffeine pharmacokinetics in cattle. Res. Vet. Sci. 2000, 69, 33-37.
10. Janus K., Grochowina B., Antoszek J., Suszycki S., Muszczyński Z.: The effect of food or water deprivation on paracetamol pharmacokinetics in calves. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2003, 26, 291-296.
11. Kawalek J. C., El-Said K. R.: Maturation development of drug metabolizing enzymes in sheep. Am. J. Vet. Res. 1990, 51, 2044-2050.
12. Kearns G. L., Reed M. D.: Clinical pharmacokinetics in infants and children, a reappraisal. Clin. Pharmacokinet. 1999, 17, 29-52.
13. Li X. D., Xia S. Q., He P., Han J., Wu M. C.: Conjugation metabolism of acetaminophen and bilirubin in extrahepatic tissues of rats. Life Sci. 2004, 74, 1307-1315.
14. Loft S., Haxholdt O., Dossing M.: Antipyrine clearance in children from single saliva samples. Br. J. Clin. Pharmacol. 1995, 19, 698-705.
15. McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D.: Pharmacokinetics of acetaminophen, antipyrine and salicylic acid in the lactating and nursing rabbit, with model predictions of milk to serum concentration ratios and neonatal dose. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999, 109, 149-160.
16. Monshower M., Witkamp R. F., Pijpers A., Verheijden J. H. M., van Miert A. S.: Dose-dependent pharmacokinetic interaction between antipyrine and paracetamol in vivo and in vitro when administered as a cocktail in pig. Xenobiotica 1994, 24, 347-355.
17. Monshower M., Witkamp R. F., Nijmeijer S. M., Pijpers A., Verheijden J. H. M., van Miert A. S. J. P. A. M.: Selective effects of bacterial infection on the hepatic clearances of caffeine, antipyrine, paracetamol and indocyanine green in the pig. Xenobiotica 1995, 25, 491-499.
18. Plewka A., Zielińska-Psuja B., Kowalówka-Zawieja J., Nowaczyk-Dura G., Plewka D., Wiaderekiewicz A., Kamiński M., Orłowski J.: Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. Acta Bioch. Pol. 2000, 47, 1129-1136.
19. Routh J. J., Shane N. A., Arredonde E. G., Paul W. D.: Determination of N-acetyl-p-aminophenol in plasma. Clin. Chem. 1968, 9, 882-889.
20. Vesell E. S., Passananti G. T., Glenwright P. A., Dvorchik B. H.: Studies on the disposition of antipyrine, aminopyrine and phenacetin using plasma, saliva and urine. Clin. Pharmacol. Ther. 1995, 18, 259-272.
21. Vital-Durand D., Piolat C., Soucheleau J., Baltassat P., Brazier J. L.: Pharmacokinetics of le<sup>1</sup> antipyrine. Comparison des concentration totales, libres et salivaires. Therapie 1998, 43, 263-266.

Adres autora: dr inż. Beata Grochowina, ul. Orłąt Lwowskich 20, 71-337; Szczecin; e-mail: B.Grochowina@biot.arszczecin.pl