

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXV, 10

SECTIO DD

1970

Z Katedry Farmakologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr habil. Grzegorz Staśkiewicz

Grzegorz STAŚKIEWICZ, Zbigniew ROLIŃSKI

Stężenie tylozyny* w tkankach i płynach ustrojowych królików
po domięśniowym stosowaniu antybiotyku

Концентрация тилозина в тканях и органических жидкостях кроликов
после внутримышечного введения препарата

Tylosin Concentration in Tissues and Organic Fluids of Rabbits after
Intramuscular Administration of the Preparation

Tylozyna, antybiotyk należący do grupy makrolidów, otrzymywana jest z hodowli promieniowca *Actinomyces fradiae* (szczoney: M 48 E 2724 i M 48 E 2728 — Mc Guire i wsp. 16). Tylozyna o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{72}NO_{17}$ jest słabą zasadą. Antybiotyk jest częściowo rozpuszczalny w metanolu, etanolu, chloroformie i eterze, dobrze rozpuszczalny w glikolu propylenowym. Rozpuszczalność w wodzie przy temp. 25°C wynosi 5 mg/ml. Prócz zasady w lecznictwie są stosowane dobrze rozpuszczalne sole: winian i fosforan tylozyny. Roztwory wodne tylozyny i jej soli zachowują stabilność w temp. pokojowej przez okres 3 miesięcy.

Na drodze hydrolizy kwasnej otrzymuje się z tylozyny antybiotyk desmykozinę o analogicznych własnościach biologicznych (11). Tylozyna posiada spektrum antibakteryjne podobne do erytromycyny. *In vitro* i *in vivo* hamuje ona wzrost drobnoustrojów Gram-dodatnich, niektórych Gram-ujemnych (szczególnie *Br. melitensis*), leptospir — 22 (*L. canicola*, *L. haemorrhagiae*, *L. pomona*), miyagawanelli. Nie działa antibakteryjnie na pałeczki z grupy *Salmonella*, *Coli Aerogenes* i *Pasteurella*. Podkreśla się dużą aktywność bakteriostatyczną i bakterioobójczą tylozyny przeciw mikoplazmom (5). Bertoldini i wsp. (4) ustalili najmniejsze stężenie hamujące wzrost *Mycoplasma gallisepticum* 0,0019 mcg/ml, natomiast najniższe stężenie bakterioobójcze — 0,156 mcg/ml. Stwierdzono, że w stężeniu 1,56 mcg/ml tylozyna działa bakterioobójczo na szczep *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* 209 P (15). Szczoney drobnoustrojów odporne na erytromycynę są również odporne na tylozynę, a szczoney penicylino-oporne, ale wrażliwe na erytromycynę są wrażliwe

* Tylozyna produkowana jest pod nazwą Tylan przez f-mę Eli Lilly Co. w postaci następujących preparatów: Tylan 50 (tylozyna zasada w glikolu propylenowym 50 mg/ml), Tylan 200 (tylozyna zasada w glikolu propylenowym 200 mg/ml) Tylan premix, zawierający fosforan tylozyny.

liwe na tylozynę. Największą aktywność antybakteryjną wykazuje tylozyna i demykozyna przy $\text{pH} = 8,0$ (3).

Toksyczność (3). Tylozyna odznacza się stosunkowo małą toksycznością. LD_{50} po podaniu dożylnym wynosi u myszy 400 mg/kg. Po stosowaniu antybiotyku szczurom w dawce 100 mg/kg *per os* przez 1 miesiąc nie stwierdzono u nich innych objawów ubocznych prócz przemijających biegunek. Podawanie antybiotyku psom w dawce 100 mg/kg przez 1 miesiąc nie powodowało objawów ubocznych. Dawki od 100 do 400 mg/kg *per os* stosowane przez 650 dni u psów powodowały nudności i wymioty, które znikaly po odstawieniu antybiotyku. LD_{50} tylozyny zasady rozpuszczonej w glikolu propylenowym, podawanej domięśniowo prosiętom wynosi 1 g/kg. LD_{50} winianu tylozyny po podaniu *per os* prosiętom wynosi 5 g/kg, LD_{50} winianu tylozyny dla kurcząt wynosi po podaniu *per os* $5,400 \pm 175,8$ mg/kg, po podaniu domięśniowym i podskórnym — $432 \pm 7,4$ mg/kg, po podaniu dożylnym — $58,6 \pm 4,14$ mg/kg.

Dotychczasowe obserwacje kliniczne wykazały skuteczność tylozyny w schorzeniach zwierząt, wywołanych przez wrażliwe na ten antybiotyk drobnoustroje. U bydła stwierdzono średnio 95% skuteczności tylozyny w przypadkach zapalenia płuc i oskrzeli, biegunkach cieląt, zapaleniu wymienia, leptospirozie i promienicy (6). Rasmussen (18) wykazał 98% skuteczności Tylanu w przypadkach zapalenia płuc i oskrzeli u prosiąt. Szereg autorów (7, 8, 9) opisało skuteczność tylozyny w leczeniu biegunek o różnej etiologii. Obserwacje przeprowadzone w Danii na prosiętach i maciorach w przypadkach zapalenia płuc, różycy, zapalenia stawów, zapalenia wymion i macicy wskazują na znaczną skuteczność tylozyny (18). W Polsce stwierdzono dużą skuteczność tylozyny w zwalczaniu dyzenterii świń (12). Stwierdzono pozytywne wyniki po stosowaniu tylozyny przy mykoplazmozach kurcząt (3) i indyków (17). Wykazano również korzystny wpływ tego antybiotyku na przyrosty wagowe prosiąt (13). Oznaczaniem stężeń tylozyny we krwi zwierząt domowych zajmowali się Saute i wsp. (19), którzy stwierdzili, że antybiotyk resorbuje się dość szybko z miejsca iniekcji i zapewnia odpowiednie stężenie lecznicze we krwi.

W dostępnej literaturze nie spotkaliśmy prac zajmujących się oznaczaniem stężeń oraz pozostałości tylozyny w tkankach i płynach ustrojowych zwierząt. Założeniem pracy było ustalenie zachowania się stężeń tylozyny we krwi i tkankach królików oraz ustalenie czasu utrzymywania się antybiotyku w organizmie.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 14 królikach mieszańcach, obojga pici, o wadze od 3,40 do 5,20 kg. Tylozynę stosowano w postaci preparatu Tylan 50 (50 mg tylozyny zasady w 1 ml 50% roztworu glikolu propylenowego z dodatkiem 4% alkoholu butylowego), produkcji firmy Lilly, seria E 04604 DE, w dawce 10 mg/kg wagi królika. Próbkę krwi pobierano po upływie 1, 3, 6, 12, 18 i 24 godz. W tych samych okresach czasu zabijano po 2 króliki, pobierając próbki mięśni, wątroby, nerek, m. sercowego, moczu i żółci. Próby krwi po odwirowaniu oraz próby tkanek przenoszono niezwłocznie po pobraniu do lodówki i przechowywano w temp. $\pm 5^\circ$ aż do momentu oznaczeń.

Oznaczanie stężeń tylozyny we krwi i tkankach wykonano metodą dyfuzji w agarze (cylinderkowo-płytkową) wg Kline i wsp. (14). Jako szczepu wzorcowego użyto *Sarcina lutea* nr 9341 otrzymanego z PZH w Warszawie. Potrzebne podłoża

Tab. 1. Ilości tylozyny odzyskiwane z tkanek królików
Tylosin amounts extracted from the tissues of rabbits

Dodano tylozyny na 1 g tkanki	Próba nr	Rodzaj tkanki							
		<i>m. gluteus medius</i>		serce		wątroba		nerka	
		odzyskano		odzyskano		odzyskano		odzyskano	
		mcg/g	%	mcg/g	%	mcg/g	%	mcg/g	%
0,8 mcg/g	1	0,50	62,0	Prób na odzyskiwanie nie wykonano					
	2	0,45	56,0						
	3	0,45	56,0						
	Średnio		58,0						
1,6 mcg/g	1	0,75	46,0	0,79	49,0	0,75	46,0	0,60	37,0
	2	0,85	53,0	0,82	51,0	0,62	38,0	0,65	40,5
	3	0,80	50,0	—	—	0,64	40,0	0,62	38,0
	Średnio		49,0		50,0		41,0		38,5

stałe i płynne oraz bufor (pożywka agarowa nr 1, żywka agarowa nr 11, żywka bulinonowa nr 3, bufor fosforanowy nr 3) przygotowano wg Grove i Randalla (10). Zawiesinę hodowli szczepu wzorcowego i ekstrahowanie antybiotyku z tkanek wykonano wg Kline i wsp. (14).

Jako standardu użyto tylozyny zasady. Roztwór podstawowy przygotowano przez rozpuszczenie 5000 mcg antybiotyku w 1 ml glikolu propylenowego. Dalsze rozcieńczenia w zakresie od 0,125 do 4 mcg/ml wykonywano przy użyciu buforu fosforanowego nr 3 o pH 8. Krzywą standardową, korekcję stref zahamowania wzrostu po poszczególnych stężeniach roztworów standardowych i próbach badanych, obliczanie zawartości tylozyny w 1 g tkanki, próby na odzyskiwanie znanych ilości antybiotyku z tkanek wykonano analogicznie jak w pracy wcześniejszej (21).

WYNIKI

Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1, 2 i 3. Stężenia tylozyny wyrażono w mcg/g tkanki lub w mcg/ml płynu ustrojowego.

Odzyskiwanie tylozyny z tkanek

Próby wykazały najlepsze odzyskiwanie antybiotyku z tkanki mięśniowej (tab. 1). Przy teoretycznej zawartości 0,8 mcg/g tkanki (mięśnie poprzecznie prążkowane) odzyskano średnio 58%; przy teoretycznej zawartości tylozyny 1,6 mcg/g tkanki — średnio 49%. Podobne ilości antybiotyku odzyskiwano z mięśnia sercowego. Mniejsze ilości antybiotyku odzyskiwano z narządów mięszzowych. Przy teoretycznej zawartości 1,6 mcg/g tkanki odzyskano z nerek średnio 41%, z wątroby średnio — 38,5%. Niższy procent odzyskiwania antybiotyku (oksyterracyna) z narządów mięszzowych stwierdzano również we wcześniejszej pracy (21).

Stężenia tylozyny w plazmie

Oznaczanie stężeń tylozyny we krwi po domięśniowym podaniu antybiotyku w dawce 10 mg/kg wykazało utrzymywanie się antybiotyku na wykrywalnym poziomie przez 12 godz. Po 18 godz. stwierdzono antybiotyki w plazmie jedynie w ilościach śladowych, a po 24 godz. nie wykazano antybiotyku we krwi. W okresach pobierania prób krwi najwyższe stężenia tylozyny obserwowano po godzinie od podania antybiotyku — średnio 1,13 mcg/ml. Najwyższe stężenie w tym samym czasie stwierdzone u królika nr 2 wynosiło 2,37 mcg/ml. Istnieje więc możliwość uzyskiwania po podaniu domięśniowym stężeń tylozyny we krwi zbliżonych do stężeń bakteriobójczych dla niektórych drobnoustrojów (15). W ciągu pierwszych 6 godz. stężenia uzyskane u królików są podobne do stężeń uzyskiwanych u zwierząt gospodarskich (19). Jednak Saute i wsp. (19) obserwowali dłuższe utrzymywanie się tylozyny

we krwi bydła, koni i świń niż u królików. Szczegółowe wyniki oznaczania stężenia tylozyny we krwi przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Stężenia tylozyny w plazmie królików po domięśniowym podaniu preparatu Tylan 50 w dawce 10 mg/kg

Tylosin concentrations in the plasma of rabbits after the intramuscular administration of Tylan 50 in the dose of 10 mg/kg

Królik nr	Godziny po podaniu					
	1	3	6	12	18	24
	Stężenie w mcg/ml					
1	1,50	—	—	—	—	—
2	2,37	—	—	—	—	—
3	1,00	0,17	—	—	—	—
4	0,75	0,47	—	—	—	—
5	0,57	0,22	0,05	0,05	—	—
6	1,62	0,25	0,12	0,05	—	—
7	0,52	0,22	0,07	0,05	śląd	b. h.
8	1,00	0,40	0,15	0,07	śląd	b. h.
9	1,25	0,37	0,20	0,08	śląd	b. h.
10	0,75	0,30	0,12	0,05	śląd	b. h.

— Nie oznaczano; b. h. — brak hamowania wzrostu drobnoustroju testowego.

— Not determined; b. h. — the growth of test micro-organism not inhibited.

Stężenia tylozyny w tkankach i płynach ustrojowych

Oznaczanie stężeń tylozyny w tkankach i płynach ustrojowych wykazało dłuższe utrzymywanie się antybiotyku na wykrywalnym poziomie w mięśniach, sercu, wątrobie, żółci i moczu aniżeli we krwi. W wyżej wymienionych tkankach oraz żółci i moczu stwierdzano antybiotyk jeszcze po 24 godz. Spośród badanych tkanek najwyższe stężenie wykazano w nerkach, nieco niższe — w wątrobie a najniższe — w mięśniach. Stwierdzono, że w ciągu pierwszych godzin po podaniu stężenia tylozyny w moczu były wyższe niż w żółci, natomiast po 24 godz. nastąpiła sytuacja odwrotna. Wyniki obserwowane w próbach na odzyskiwanie znanych ilości tylozyny z poszczególnych tkanek wskazują na niemożliwość całkowitego wyekstrahowania antybiotyku z tkanek. Należy więc założyć, że stężenia tylozyny w tkankach królików w rzeczywistości są jeszcze wyższe. Szczegółowe wyniki oznaczania stężeń tylozyny w tkankach i płynach ustrojowych przedstawiono w tab. 3.

Tab. 3. Stężenie tylozyny w tkankach i płynach ustrojowych królików po domięśniowym stosowaniu preparatu „Tylan 50” w dawce 10 mg/kg

Tylosin concentration in tissues and organic fluids of rabbits after the intramuscular administration of "Tylan 50" in the dose of 10 mg/kg

Godziny po podaniu	Królik (nr)	Stężenia tylozyny w mcg/g tkanki lub mcg/ml płynu ustrojowego					
		mięśnie	serce	wątroba	żółć	nerka	mocz
		(<i>m. gluteus medius</i>)					
1	1	0,15	0,20	0,35	2,25	0,50	13,75
	2	0,20	0,30	0,42	2,75	0,60	21,20
	Średnio	0,17	0,25	0,38	2,50	0,55	17,40
3	3	0,15	0,16	0,30	3,25	0,38	10,00
	4	0,15	0,20	0,41	4,00	0,45	20,00
	Średnio	0,15	0,18	0,35	3,62	0,41	15,00
12	5	0,12	0,15	0,38	4,00	0,45	1,25
	6	0,10	0,12	0,15	—	0,50	4,04
	Średnio	0,11	0,13	0,23	4,00	0,47	2,64
18	7	0,12	0,20	0,25	2,50	0,80	—
	8	0,10	0,13	0,18	3,90	0,40	—
	Średnio	0,11	0,16	0,21	3,20	0,60	—
24	9	0,10	0,12	0,25	1,25	0,30	0,62
	10	0,07	0,10	0,13	1,62	0,25	0,52
	Średnio	0,08	0,11	0,19	1,43	0,27	0,57

— nie oznaczono. not determined

WNIOSKI

1. Tylozyna stosowana domięśniowo u królików pod postacią preparatu Tylan 50 w dawce 10 mg/kg dobrze resorbuje się z miejsca iniekcji i utrzymuje się we krwi na wykrywalnym poziomie przez 12 godz.

2. Domięśniowe podanie tylozyny w dawce 10 mg/kg u królików zapewniało po 1 godzinie od podania antybiotyku występowanie we krwi wysokich stężeń bakteriostatycznych, a w niektórych przypadkach — bakteriobójczych.

3. Najwyższe stężenia tylozyny stwierdzano w moczu, żółci i nerkach.

4. W tkankach oraz w moczu i żółci tylozyna utrzymywała się na wykrywalnym poziomie dłużej aniżeli we krwi.

PIŚMIENNICTWO

1. Anon.: Tylan Injection 200 for Use in Pigs and Cattle. Eli Lilly Co. Master ref. IFD (MP/66) 24.
2. Barnes L. E., Ose E. E., Gossett F. O.: Treatment of Experimental PPLO Infections in Young Chickens with Tylosin, a New Antibiotic. *Poult. Sci.* 39, 1376, 1960.
3. Berkman R. N., Richards E. A., Van Duyn R. L., Kline R. M.: The Pharmacology of Tylosin, a New Antibiotic, in the Chicken. *Agents Ann.* 1960.
4. Bertoldini G., Marca G., Di Modugno G.: Ricerche sulla terapia della micoplasmosi aviare. *Arch. Vet. Ital.* 20, 273 (1969).
5. Duthie I. F.: Sensitivity of Avian Mycoplasma to Tylosin. *Elanco Index* 1, 37, 1966.
6. Duthie I. F.: Clinical Treatment of Disease. Eli Lilly Co. Master ref. IFD (MP/66) 12.
7. Gardner P. L.: Tylosin (Corresp.) *Vet. Rec.* 77, 1493, 1965.
8. Gosset F. O.: Clinical Treatment of Swine Dysentery. Eli Lilly Co. Master ref. IFD (MP/66) 22.
9. Gosset F. O., Miyat J. A.: A New Antibiotic in Treatment of Swine Dysentery *Vet. Med.*, 59, 169, 1964.
10. Grove D. C., Randall W. A.: Assay Methods of Antibiotics. A Laboratory Manual. Medical Encycl. Inc., New York 1955.
11. Hamill R. L., Haney M. E., Stamper M. C., Wiley P. F.: Tylosin, a New Antibiotic. II. Isolation, Properties and Preparation of Desmycosin, a Microbiologically Active Degradation Product. *Antibiotics and Chemother.*, 11, 328, 1961.
12. Janowski H., Wijaszko T.: Wpływ tylozyny na przebieg dyzenterii świń w hodowlach wielkostatnych. *Med. Wet.*, 24, 11, 1968.
13. Jordan C. E. i wsp.: Tylosin, a New Antibiotic Growth Stimulant for Swine *Ann. Sci.*, 19, 1269, 1960.
14. Kline R. M., Redman C. E., Tepe J. B., Hamill R. L.: Antibiotic Residues, Microbiological Procedures. *J. Agr. Food Chem.*, 13, 301, 1965.
15. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: Antibiotics, Origin, Nature and Properties. Pergamon Press, PWN, Warszawa 1967.

16. McGuire J. M., Boniece W. S., Higgins C. E., Hoehn M. M., Stark W. W., Westhead J., Wolfe R. N.: Tylosin, a New Antibiotic. I. Microbiological Studies. *Antibiotics and Chemotherapy*, 11, 320, 1961.
17. Ose E. E., Barnes L. E.: Treatment of Infectious Sinusitis in Turkeys with Tylosin Tartrate. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 137, 421, 1960.
18. Rasmussen H.: Clinical Appraisal for Tylosin a New Specific Antibiotic against PFLO Infections. Eli Lilly Co. Master ref., IFD (MP/66) 18.
19. Saute R. A., Corbet H. T., Bailey R. W.: Blood Level Studies in the Bovine, Equine, Porcine Species with Tylosin, a New Antibiotic. *Vet. Med.*, 57, 982, 1962.
20. Smith H. W.: Tylosin, *Vet. Rec.*, 77, 1342, 1965.
21. Staśkiewicz G., Roliński Z.: Oznaczanie pozostałości antybiotyku w tkankach i płynach ustrojowych kurcząt po podaniu z karmą oksytetracyliny paszowej „Polfa”. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio DD*, vol. XXIV, 129—138, 1969.
22. Wood G. E., Alexander A. D.: Tylosin Therapy in Experimental Leptospirosis. *Antibiotics and Chemotherapy* 11, 592, 1961.

РЕЗЮМЕ

Определяли концентрации тилозина в крови, тканях, моче и желчи у кроликов обоего пола весом от 3,4 до 5,2 кг. Тилозин в виде препарата Tylan 50 фирмы Eli Lilly Co. вводили однократно внутримышечно (доза 10 мг/кг веса тела кролика). Определение концентраций проводили диффузионным методом в агаре при применении стандартного штамма *Sarcina lutea* 9341.

Констатировали, что тилозин вызывает появление высоких концентраций антибиотика как в крови, так и тканях, моче, желчи. В тканях, моче и желчи концентрация антибиотика сохранялась дольше, чем в крови.

SUMMARY

Tylosin concentrations were determined in the blood, tissues, urine and bile of rabbits of either sex, weighing from 3.4 to 5.2 kg. Tylosin in the form of Tylan 50, the preparation of Eli Lilly Co., was intramuscularly administered in the single dose of 10 mg/kg of the body weight of a rabbit. The determination of concentrations was done by diffusion in agar gel method using a standard strain *Sarcina lutea* No. 9341.

It was stated that high tylosin concentrations appeared in the blood, tissues, urine and bile. In tissues, urine and bile the antibiotic kept on the detectable level much longer than in blood.