

Cezary KOWALSKI

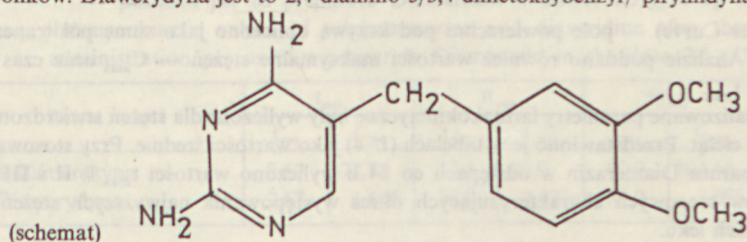
Analiza farmakokinetyczna stężeń sulfamerazyny i diawerydyny w surowicy cieląt po stosowaniu preparatu „Diamerazin” celem wyznaczenia okresu karencji*

Pharmacokinetic Analysis of Sulphamerazine and Diaveridin Concentration in Blood of Calves after the Application of a Preparate “Diamerazin” to Determine a Recommended Withdrawal Period

Фармакокинетический анализ концентраций сульфамеразина и диаверидина в сыворотке телят после применения препарата „Диамераж” под углом определения периода каренции

Pomimo powszechnego stosowania antybiotyków sulfonamidy w lecznictwie zwierząt nie straciły znaczenia, a nawet w ostatnich latach obserwuje się zwiększone zainteresowanie tą grupą leków. Sulfonamidy działają bakteriostatycznie. Uważa się, że mechanizm działania sulfonamidów jest związany z antagonizmem konkurencyjnym w stosunku do kwasu *p*-aminobenzoowego (PABA), który jest jednym z czynników syntezy kwasu foliowego (8, 20). Ze względu na występującą coraz częściej oporność bakterii na sulfonamidy dokonano próby łączenia ich z innymi chemioterapeutykami i wprowadzono do lecznictwa trimetoprim (TMP).

Synteza diawerydyny została opisana przez Falco i wsp. w 1951 r. (6), a do lecznictwa wprowadzono ją na początku lat sześćdziesiątych jako lek do zwalczania kokcydiozy u drobiu i królików. Diawerydyna jest to 2,4-diamino-5/3,4-dimetoksybenzyl/-pirymidyna (schemat).



W piśmiennictwie brak jest informacji o badaniach farmakokinetycznych dotyczących diawerydyny. W latach osiemdziesiątych krajowy przemysł farmaceutyczny opracował syntezę diawerydyny. Z tego faktu wynikała potrzeba badań nad stężeniami tego związku we krwi zwierząt dla ustalenia dawkowania i okresu karencji. Większość prac cytowanych w piśmiennictwie dotyczących sulfonamidów czy TMP przeprowadzono po parenteralnym stosowaniu tych leków (5, 7, 13). W praktyce preparaty te stosowane są najczęściej doustnie. Analiza farmakokinetyczna stężeń

* Fragment pracy doktorskiej.

leków w ustroju po podaniu dożylnym nie uwzględnia procesów wchłaniania, rozmieszczania oraz nie oddaje w pełni tempa przemian metabolicznych i eliminacji obserwowanych przy podaniu pozanaczyniowym. Preparat Diamerazin przeznaczony jest dla zwierząt do stosowania doustnego, dlatego też w analizie farmakokinetycznej uwzględnione zostały również wskaźniki dostępności biologicznej.

Celem pracy było określenie tempa eliminacji z ustroju składników czynnych preparatu Diamerazin na podstawie analizy farmakokinetycznej stężeń tych leków we krwi.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 12 cielętach rasy nob o masie ciała 52–65 kg w wieku ok. 1,5 miesiąca, żywionych mlekopaniem i sianem *ad libitum*. Do badań użyto preparat sulfonamidowy potencjalizowany diawerydyną — Diamerazin (Polfa) o następującym składzie: sulfamerazyna 0,1 g, diawerydyna 0,02 g, laktoza do 1,0 g. Preparat podawano *per os* w dawkach leczniczych jednorazowo oraz trzykrotnie w odstępach 24 h w dawce 2,5 g/10 kg m.c. Krew do oznaczeń pobierano z żyły jarzmowej do probówek z dodatkiem heparyny (0,05 ml na 5 ml krwi) po 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 84, 106 h. Do oznaczania sulfonamidów użyto metody kolorymetrycznej według Brattona i Marshalla (1) w modyfikacji Rasmussena (18). Diawerydynę oznaczano według zmodyfikowanej metody Klimowicz (10).

Za wzór matematycznego opisu stężeń sulfamerazyny i diawerydyny we krwi cieląt przyjęto model jednokompartamentowy, dla podania pozanaczyniowego (4). Podstawę do wyboru takiego modelu stanowiły wyniki innych autorów, świadczące o szybkim rozmieszczeniu sulfonamidów w ustroju zwierząt (13, 15). Dla obliczenia podstawowych parametrów farmakokinetycznych przyjęto według Danko (4) szereg równań modelowych. Stałą szybkości eliminacji k_{el} wyznaczono z równania:

$$C = B - k_{el} \cdot t$$

gdzie: C — obserwowane stężenie, B — oczekiwane stężenie dla $t = 0^h$, e — podstawa logarytmu naturalnego, t — czas w godz.

Okres półtrwania leku w surowicy — $t_{1/2}$ wyznaczono z równania:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

AUC (Area Under Curve) — pole powierzchni pod krzywą obliczono jako sumę pól trapezów i trójkątów (16). Analizie poddano również wartości maksymalne stężeń — C_{max} oraz czas ich występowania — t_{max} .

Wszystkie analizowane parametry farmakokinetyczne były wyliczone dla stężeń stwierdzonych u poszczególnych cieląt. Przedstawiono je w tabelach (1–4) jako wartości średnie. Przy stosowaniu trzykrotnym preparatu Diamerazin w odstępach co 24 h wyliczono wartości t_{max} I, II i III dla trzech przedziałów czasowych charakteryzujących okres występowania najwyższych stężeń po kolejnych podaniach leku.

Dla ustalenia okresu karencji, po upływie którego stężenie pozostałości sulfamerazyny i diawerydyny we krwi osiągnie poziom przyjęty za dopuszczalny, to jest — 0,1 $\mu\text{g/ml}$ wg WHO (21, 22), posłużono się równaniem:

$$t_{c'} = - \frac{\ln c - \ln B}{k_{el}}$$

gdzie: $t_{c'}$ — przewidywany czas osiągnięcia stężenia pozostałości $c' = 0,1 \mu\text{g/ml}$, c' — wartość stężenia dopuszczalnego (0,1 $\mu\text{g/ml}$) w surowicy, $\ln$ — logarytm naturalny, B — wartość stężenia w czasie t_0 , k_{el} — wartość stałej eliminacji.

Tab. 1. Średnie stężenia sulfamerazyny i diawerydyny we krwi cieląt w $\mu\text{g/ml}$ po podaniu jednorazowym i trzykrotnym *per os* preparatu Diamerazin w dawce 2,5 g/10 kg m.c.

Mean values of concentration of sulphamerazine and diaveridine in blood of calves after a single and three times repeated administration *per os* of a preparate Diamerazin in the dose 2,5 g/10 kg b.w.

Czas podania (h)	Wartości stężeń w $\mu\text{g/ml}$			
	Podanie jednorazowe		Podanie trzykrotne	
	sulfamerazyna	diawerydyna	sulfamerazyna	diawerydyna
1	16,633	1,333	14,422	1,375
3	50,870	1,615	36,208	0,787
6	59,865	2,115	45,952	1,020
8	60,405	2,197	50,850	0,632
12	61,862	1,217	56,525	0,195
24	17,622	1,102	31,542	0,227
36	13,457	0,537	97,307	2,825
48	3,992	0,708	56,158	1,608
60	4,694	0,715	104,66	2,728
84	7,066	0,715	58,927	2,315
106	2,366	0,620	16,152	0,973

Tab. 2. Średnie parametry farmakokinetyczne sulfamerazyny i diawerydyny po jednorazowym podaniu *per os* preparatu Diamerazin w dawce 2,5 g/10 kg m.c.

Mean pharmacokinetic values of sulphamerazine and diaveridine after a single administration *per os* of a preparate Diamerazin in the dose 2,5 g/10 kg b.w.

Badane związki	$t_{\max}$	$C_{\max}$	k_{el}	$t_{1/2}$	AUC
Sulfamerazyna	7,17	82,66	0,03245	22,39	1779
Diawerydyna	6,67	2,587	0,01433	50,12	137,65

Tab. 3. Średnie parametry farmakokinetyczne sulfamerazyny i diawerydyny po trzykrotnym podaniu *per os* preparatu Diamerazin w dawce 2,5 g/10 kg m.c.

Mean pharmacokinetic values of sulphamerazine and diaveridine after three times repeated administration *per os* of a preparate Diamerazin in the dose 2,5 g/10 kg b.w.

Badane związki	I _{max}		II _{max}		III _{max}		AUC	k_{el}
	$t_{\max}$	$C_{\max}$	$t_{\max}$	$C_{\max}$	$t_{\max}$	$C_{\max}$		
Sulfamerazyna	8,67	72,76	37,0	98,0	60,0	104,66	6748	0,089
Diawerydyna	2,67	1,648	36,0	2,825	68,0	3,098	211,7	0,0388

Tab. 4. Średnie wartości po podaniu jednorazowym i trzykrotnym *per os* preparatu Diamerazin w dawce 2,5 g/10 kg m.c.

Mean values t_e after a single and three times repeated administration *per os* of a preparate Diamerazin in the dose 2,5 g/10 kg b.w.

t_e	Podanie jednorazowe		Podanie trzykrotne	
	sulfamerazyna	diawerydyna	sulfamerazyna	diawerydyna
(h)	199	239	194	178

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wykazały dobrą dostępność biologiczną sulfamerazyny i diawerydyny po doustnym stosowaniu preparatu Diamerazin. Poziom sulfamerazyny po 1 h osiąga wartość bliską stężenia terapeutycznego, a po 3 h znacznie przewyższa wartość stężenia leczniczego. Z uwagi na to, że sulfonamidy działają bakteriostatycznie, stężenie tych leków we krwi nie powinno spadać poniżej minimalnego poziomu terapeutycznego (MIC – Minimal Inhibitory Concentration). Przyjmuje się za taki poziom 25 µg/ml, jakkolwiek niższe stężenia w wielu przypadkach są wystarczające dla zapewnienia efektu terapeutycznego (3). W wykonanych badaniach wysoki poziom terapeutyczny sulfamerazyny utrzymywał się we krwi aż do 12 h od podania leku, średnio w granicach 50,8–61,8 µg/ml. Po 24 h od podania preparatu Diamerazin obserwowano stężenia sulfamerazyny wynoszące 17,6 µg/ml, zwykle jeszcze przewyższające wartość MIC dla kombinacji sulfonamidów z TMP wobec szczepów *Salmonella* sp. pochodzenia zwierzęcego (19). Wskazuje to na dobrą dostępność biologiczną dla leku stosowanego doustnie u cieląt w wieku 1,5 miesiąca, to jest w okresie częściowego uruchomienia funkcji przedłożądków (17). Badania innych autorów potwierdzają dobrą dostępność biologiczną sulfamerazyny po stosowaniu *per os* u przeżuwaczy (9).

Analizując $t_{\max}$ przy jednorazowym podaniu Diamerazinu u cieląt wykazano zbliżony czas występowania stężeń maksymalnych ($C_{\max}$) dla sulfamerazyny i diawerydyny; dla sulfamerazyny wynosił on 7,17 h, a dla diawerydyny 6,67 h. Potwierdza to możliwość stosowania łącznego sulfamerazyny z diawerydyną, ponieważ potencjalizacja działania sulfonamidów przy skojarzonym ich stosowaniu z pochodnymi diaminopirymidyny występuje najbardziej wyraźnie, gdy farmakokinetyczne właściwości tych leków są zbliżone (3). Podobne właściwości w zakresie dostępności biologicznej wykazano również w przypadku diawerydyny. Obserwowane we krwi cieląt stężenia powyżej 1 µg/ml już po 1 h od podania *per os* preparatu Diamerazin świadczą o szybkim tempie jego wchłaniania.

Analizując różnice w wartościach AUC pomiędzy sulfamerazyną i diawerydyną po jednorazowym podaniu Diamerazinu można sądzić o istnieniu odmiennych przestrzeni dystrybucyjnych dla obu leków w organizmie, jak ma to miejsce w przypadku sulfonamidów i TMP (2, 14, 15, 18). Wyliczona wartość AUC dla sulfamerazyny wynosiła 1779 µg/ml/h, a dla diawerydyny 137,6 µg/ml/h; można więc przyjąć, że dla sulfonamidów głównym kompartmentem dystrybucyjnym jest krew, a dla diawerydyny tkanki i płyny śródtkankowe. Stąd niezależnie od poziomu dawkowania obu składników czynnych wynika niższa wartość AUC w przypadku diawerydyny.

Wskaźniki dostępności biologicznej sulfamerazyny po stosowaniu trzykrotnym preparatu Diamerazin są w zasadzie zbliżone do parametrów stwierdzanych po podaniu pojedynczym. Wyliczone wartości dla pierwszego przedziału $I_{\max}$

to znaczy $t_{\max}$ i $C_{\max}$ praktycznie nie różniły się od analogicznych po podaniu pojedynczym. Natomiast w drugim i trzecim przedziale czasowym $II_{\max}$ i $III_{\max}$ obserwowano wydłużenie czasu wystąpienia stężenia maksymalnego $t_{\max}$ oraz nieco wyższe wartości $C_{\max}$. Różnice w zakresie $t_{\max}$ przy podaniach wielokrotnych można próbować wyjaśnić odmiennym tempem rozmieszczania i stopniem wiązania z białkami składników czynnych przy powtarzanym stosowaniu Diamerazinu.

Posługując się wartością stałej eliminacji (k_{el}) wprowadzoną do równania matematycznego ustalono okres niezbędny dla eliminacji pozostałości sulfamerazyny i TMP do poziomu dopuszczalnego, to jest 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (21, 22). Wartości t_c dla sulfamerazyny przy podaniu jednorazowym i trzykrotnym preparatu Diamerazin praktycznie się nie różniły i wynosiły odpowiednio 199 i 194 h. W przeliczeniu na dni stanowi to 8-dniowy okres karencji. Dla diawerydyny wartość t_c przy podaniu jednorazowym wynosiła 239 h, czyli 10-dniowy okres karencji. Natomiast wyliczona wartość t_c przy stosowaniu Diamerazinu przez 3 dni wynosiła 178 h (8-dniowy okres karencji). Na różnice w wyliczonych wartościach t_c przy podaniu jednorazowym i trzykrotnym leku mogły rzutować takie czynniki, jak: różnice wieku, sprawność funkcjonalna nerek i wątroby. Należy zatem przyjąć dłuższy okres karencji — to jest 10 dni.

Ustalony okres karencji dla sulfamerazyny i diawerydyny u cieląt po stosowaniu preparatu Diamerazin na podstawie analizy farmakokinetycznej stężeń we krwi oraz zastosowanie równania matematycznego dla określenia t_c odpowiada ustalonym przez innych autorów okresom na podstawie kosztownej i pracochłonnej metody uśmiercania zwierząt i oznaczania pozostałości we wszystkich tkankach (9, 14).

WNIOSKI

1. Wykonane badania wykazały dobrą dostępność biologiczną sulfamerazyny i diawerydyny po doustnym stosowaniu preparatu Diamerazin.

2. Wykazano zbliżony czas występowania stężeń maksymalnych ($C_{\max}$) dla sulfamerazyny i diawerydyny po stosowaniu Diamerazinu, co potwierdziło możliwość łącznego stosowania tych leków.

3. Poziom leczniczy sulfamerazyny i diawerydyny utrzymuje się w ciągu 24 h po jednorazowym podaniu badanego preparatu.

4. Wykonana analiza farmakokinetyczna stężeń sulfamerazyny i diawerydyny we krwi cieląt potwierdziła możliwość wyznaczenia równania dla wartości t_c wskazującej okres niezbędny do eliminacji pozostałości tych związków do poziomu dopuszczalnego (0,1 $\mu\text{g/ml}$).

5. Dla preparatu Diamerazin określono 10-dniowy okres karencji, przyjmując za podstawę okres eliminacji diawerydyny, to jest składnika dłużej utrzymującego się w organizmie.

PIŚMIENNICTWO

1. Bratton A. C., Marshall E. K.: A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.*, **128**, 537, 1939.
2. Bushby S. R. M., Hitchings R. H.: Trimethoprim, a sulfonamide potentiator. *Brit. J. Pharmacol. Chemotherap.*, **33**, 72, 1968.
3. Bushby S. R. M.: Trimethoprim and sulphonamides. Laboratory studies. *Sth Afr. Med. J.*, suppl. 3, 1970.
4. Danek A.: *Farmakokinetyczne metody badania leków*. Wydawnictwo Akcydensowe, Warszawa 1979.
5. Eich K. O.: *Handbuch der Schweine Krankheiten*. Kamlage—Verlag, Münster, 1982.
6. Falco E. A., Du Breuil S., Hitenings G. H.: 2-4-Diamino-pyrimidines as antimalarials. *J. Am. Chem. Cos.*, **73**, 3758, 1951.
7. Grose W. E., Bodey G. P., Loo T. L.: Clinical pharmacology of intravenously administered trimethoprim-sulfamethaxazole. *Antmicrob. Ag. Chemother.*, **15**, 447, 1979.
8. Grossman A. F., Calabi V.: The biosynthesis of folic acid. *Fed. Proc.*, **28**, 289, 1969.
9. Hayashi M., Bourne D. W. A., Bevill R. F., Koritz G. D.: Disposition of sulfonamides in food-producing animals: pharmacokinetics of sulfamerazine in ewe lambs. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1578, 1979.
10. Klimowicz A.: *Diagnostyka laboratoryjna*. **17**, 35, 1981.
11. Lapresle C.: Les sulfamides en Medecine. *Bull. Inst. Pasteur*. **84**, 181, 1986.
12. Lecombo U., Mausuan P., Duangmani Ch., Beujadol P., M'Cminn M. T.: Clinical evaluation of Co-trimaxazole and furazolidone in treatment of shigellosis in children. *Brit. Med. J. Supp.*, **3**, 23, 1972.
13. Nielsen P.: The metabolism of four sulfonamides in cows. *Biochem. J.*, **136**, 1039, 1973.
14. Nielsen P., Rasmussen F.: Elimination of TMP in swine: comparison of results obtained by three analytical methods. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **37**, 309, 1975.
15. Nielsen P., Rasmussen F.: Trimethoprim and sulphadoxine in swine. Half-lives, volume of distribution and tissue concentrations. *Zbl. für Veterinärmedizin.*, **22A**, 546, 1975.
16. Notari E. R.: *Wstęp do biofarmacji i farmakokinetyki*. PZWL, Warszawa 1978.
17. Nouws J. F. M., Vree T. B., Boakman M., Driessens F., Breukihk H. J., Mevins D.: Age and dosage dependency in the plasma disposition and the renal clearance of sulfamethazine and its N₄-acetyl and hydroxy metabolites in calves and cows. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 642, 1986.
18. Rasmussen F.: Renal and mammary excretion of trimethoprim in goats. *Vet. Rec.*, **87**, 14, 1970.
19. Roliński Z., Wernicka-Furmaga R., Kowalski C.: Aktywność flumechiny wobec szczepów *Salmonella* sp. w badaniach *in vivo* oraz zakażeniach eksperymentalnych u myszy. *Med. Wet.*, **44**, 461, 1988.
20. Woods D. D.: The relation of *p*-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. *Br. J. Exp. Path.*, **21**, 74, 1940.
21. WHO. Principles governing consumer safety in relation to pesticide residues. *Tech. Rep. Ser.*, **260**, 1963.
22. WHO. Assessment of the carcinogenicity and mutagenicity of chemicals. *Tech. Rep. Ser.*, **546**, 1974b.

SUMMARY

To describe the concentration of sulphamerazine and diaveridin in blood of calves a mathematic one compartment model for extravascular application was used. In this model parameters visualizing a rate of elimination (k_{el} and $t_{1/2}$) were determined. The experiments on calves basing on the determination of c_{max} , t_{max} and AUC showed a good biological accessibility of diamerazin. Pharmacokinetic analysis confirmed the possibility to determine the value of t_c representing time indispensable to eliminate residues of sulphamerazine and diaveridin to an acceptable level — 0.1 µg/ml.

РЕЗЮМЕ

Как математический образец описанна концентрация сульфамеразина и диаверидина в крови телят принято модель однокомпарментового образца для внесосудного применения. Употребляя этот образец определено параметры (k_{el} , $t_{1/2}$) представляющие темп элиминации активных компонентов препарата Диамеразин. В исследованиях у телят определено хорошую биологическую доступность сульфамеразина и диаверидина после перорального применения препарата Диамеразин на основе определения на основе определения c_{max} , t_{max} и AUC. Проведенный анализ фармакокинетический подтвердил возможность определения величины t_c , показывающий период времени необходимый для элиминации остатков сульфамеразина и диаверидина к допустимому уровню — 0,1 µg/ml.

MATERIAL I METODY

Badania wykonano na 30 krowkach rasy holenderskiej o masie ciała ok. 350 kg, trzymających je w stadzie LSK w Białym. Grupa doświadczalna krowek otrzymała 24 h przed podaniem sulfamerazyny 1% roztwór chlorku natriowego (NaCl) w dawce 10 mg/kg m.c. zwierzęcia rozpuszczonego w 0,9% NaCl. Po upływie 24 h krowki grupy badanej (n = 20) otrzymały sulfamerazynę w dawce 0,2 g/kg m.c. domacielami krwi do oznaczeń przeliczono z dodatkiem heparyny (Heparinum, Polfa, 5000 j.m./ml) w dawce 0,01 ml na 10 ml krwi. Krew do analizy pobierano w następujących odstępach czasowych: 1, 2, 12, 24, 36 h. Następnie po pobraniu krwi składowano, a surowicę zamrażano i przechowywano w temp. -20°C aż do wykonania oznaczeń. Po ostatecznym pobraniu krwi krowki poddawano ubojowi, wykonywano badania bakteriologiczne i pobierano nerki do badań histopatycznych.

Sulfamerazynę oznaczano metodą kolorymetryczną (6) w moczniku. Krowki z grupy kontrolnej zabito przed podaniem leku. Z krwi pobrano 10 ml i wyodrębniono surowicę. Do każdej zmioty badanej próbki surowicy dodano 0,1 ml roztworu 1% chlorku natriowego. Ciepło utrudniło — 0,05 mg/ml. Za 24 h od podania dawki krwi skierowano do krwi przyjęto model jednodzielnikowy, dla ustalenia pozostałości dawki 0,1 µg/ml. Podano do

* Fragment pracy doktorskiej.