

Wybrane aspekty farmakokinetyki tiamuliny u kurcząt rzeźnych

MAŁGORZATA POMORSKA-MÓL, CEZARY J. KOWALSKI*

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Zakład Farmakologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Pomorska-Mól M., Kowalski C. J.

Selected aspects of pharmacokinetics of tiamulin in broiler chicken

Summary

The aim of the study was to develop an analytical method adequate to determine the tiamulin in plasma after administration in therapeutic values, calculation of the pharmacokinetic parameters of tiamulin in broiler chickens and the evaluation of the bioequivalence of two veterinary formulations. In order to determine the tiamulin in investigated material the HPLC technique with UV-VIS detection was used. After oral administration of tiamulin as Tiamulina 10% and Tiamutin 12.5% the following pharmacokinetic parameters were calculated: AUC, C_{max} , t_{max} , $t_{0.5}$, V_d , k_{el} and MRT. For the pharmacokinetics analysis a PK Solution 2.0 computer program was used. Results of the study indicate quite a rapid absorption of tiamulin from the gastrointestinal tract as well as its quick elimination from plasma. The high value of the volume of distribution indicates the peripheral compartment is a target compartment for tiamulin. Results of statistical analysis including pairs of pharmacokinetic parameters like t_{max} , C_{max} , AUC and the evaluation of percentage differences among them, allows the authors to conclude that formulations used in the study are bioequivalent.

Keywords: tiamulin, pharmacokinetics, broiler chickens

Rosnąca świadomość i potrzeba weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego, w tym bezpieczeństwa żywności, wymuszają konieczność prowadzenia bardziej precyzyjnych badań zarówno nad mechanizmem działania leków, jak i nad ich losami w organizmie zwierząt rzeźnych. Pomimo wieloletniego stosowania tiamuliny w medycynie weterynaryjnej dane dotyczące jej losów w ustroju gatunków docelowych, zwłaszcza drobiu, są bardzo ograniczone (2 publikacje z lat 70. i 80.). Nieliczne badania nad farmakokinetyką tego związku były prowadzone wiele lat temu z wykorzystaniem technik mikrobiologicznych. Dane piśmiennictwa podają przykłady zastosowania technik chromatograficznych do oznaczania tiamuliny w premiksach i paszach dla zwierząt (17), jajach (5), produktach leczniczych weterynaryjnych (8) i miodzie (15), w których tiamulina występowała w stężeniach wyższych niż we krwi po podaniu w dawkach terapeutycznych. Do chwili obecnej brak jest informacji piśmiennictwa na temat wykorzystania techniki HPLC do oznaczania tiamuliny w osoczu czy surowicy, po jej podaniu w dawkach terapeutycznych.

Tiamulina jest antybiotykiem półsyntetycznym – pochodną naturalnie występującej pleuromutyliny (4,

18). Wszystkie związki z grupy pochodnych pleuromutyliny cechują się wspólnym i unikalnym mechanizmem działania i nie wykazują krzyżowej oporności z innymi stosowanymi obecnie antybiotykami (3, 6). Działają bakteriostatycznie poprzez hamowanie syntezy białek bakteryjnych (wiążą się z podjednostką 50S rybosomów prokariotycznych) (6, 16). Pochodne pleuromutyliny są związkami o charakterze zasadowym. Cechuje je bardzo dobra rozpuszczalność w tłuszczach, co korzystnie wpływa na ich wchłanianie z przewodu pokarmowego oraz proces dystrybucji w ustroju. Spektrum działania przeciwbakteryjnego tiamuliny obejmuje bakterie Gram-dodatnie, bakterie beztlenowe, krętki jelitowe, a także niektóre bakterie Gram-ujemne. Szczególnie dobrą skuteczność omawiany antybiotyk wykazuje przeciwko mykoplazmom (4, 18). Tiamulina jest obecnie stosowana u świń oraz drobiu (11, 18).

Celem badań było opracowanie odpowiednio czulej metody analitycznej, umożliwiającej oznaczenie tiamuliny w osoczu po podaniu w dawkach terapeutycznych, a następnie wyznaczenie jej podstawowych wskaźników farmakokinetycznych u kurcząt rzeźnych obejmujących pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC), stężenie maksymalne ($C_{maks.}$), czas wy-

stapienia stężenia maksymalnego ($t_{maks.}$), biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$), objętość dystrybucji (V_d), stała eliminacji (k_{el}) oraz średni czas przebywania leku w ustroju (MRT). Kolejnym etapem było przeprowadzenie oceny biorównoważności pomiędzy dwoma użytymi w badaniach produktami leczniczymi.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 74 kurczętach rzeźnych obojga płci, o wyjściowej masie ciała 1640-2550 g. Przed rozpoczęciem doświadczenia kurczęta przeszły 7-dniową kwarantannę. Wszystkie ptaki uznano za zdrowe, co pozwoliło na zakwalifikowanie ich do dalszej procedury badawczej. Kurczęta w czasie kwarantanny i w okresie doświadczenia były trzymane w dobrze wentylowanych pomieszczeniach wiwarium Zakładu Farmakologii AR w Lublinie. Ptaki były żywione mieszanką śrut zbożowych bez antybiotyków, kokcydiostatyków i stymulatorów wzrostu oraz otrzymywały wodę do picia *ad libitum*. Leki podawane były na czczo, zgodnie z wytycznymi odnośnie do badań farmakokinetycznych i biorównoważności. W dniu doświadczenia ptaki podzielono losowo na dwie grupy doświadczalne (A i B, $n = 35$ szt.), a także wyodrębniono grupę kontrolną (K, $n = 4$).

Leki. W badaniach użyto dwóch produktów zawierających w składzie tiamulinę, pochodzących od różnych producentów. Ptakom z grupy A podawano produkt leczniczy weterynaryjny Tiamulina 10% (Chemifarma, Włochy) – próba: n:040118, termin ważności: 31.01.2005 (znajdujący się w trakcie procedury rejestracyjnej – produkt badany) natomiast ptakom z grupy B produkt Tiamutin 12,5% (Novartis, Szwajcaria) nr serii: G350, termin ważności: 11.2006 (produkt referencyjny). Oba leki były w formie roztworu wodnego, przeznaczone do stosowania z wodą do picia.

Aparatura. W skład układu chromatograficznego wchodziła: pompa do HPLC Varian Star 9002 i detektor UV-VIS (Varian). Rozdziały wykonywano na kolumnie XTerra[®]RP₁₈ o średnicy ziarna 5 μ m i wymiarach 4,6 \times 150 mm (Waters). Próbkę o objętości 10 μ l dozowano przy pomocy zaworu pętlowego Rheodyne.

Kurczętom z grup doświadczalnych leki podawano w roztworze wodnym, indywidualnie, doustnie (do wola) sondą metalową, w jednakowej dawce 40 mg substancji czynnej/kg m.c. Ptaki z grupy kontrolnej nie otrzymały żadnych leków. Osocze od tych ptaków przeznaczono do badań na odzysk substancji wzorcowej (tzw. osocze czyste). Próbkę krwi pobierano do heparynizowanych probówek w trakcie skrwawienia, przy wywołanej farmakologicznie utracie świadomości po upływie 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 i 8 h od podania produktów leczniczych weterynaryjnych. Próbkę osocza poddawano mrożeniu i przechowywano w temperaturze -30°C do czasu przeprowadzenia analiz chromatograficznych. Program badań został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (opinia nr 28/2004).

Zawartość tiamuliny w materiale badanym została oznaczona według procedury analitycznej opracowanej w Zakładzie Farmakologii z wykorzystaniem informacji zawartych w piśmiennictwie (12, 14, 17). Fazę ruchomą sta-

nowiła mieszanina 0,04 M diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4) i acetonitrylu (ACN) w stosunku objętościowym 65 : 35. Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę podczas rozdzielania wynosiła 1,5 ml/min. Detekcje UV prowadzono przy długości fali $\lambda = 208$ nm. Pracą chromatografu sterowano przy pomocy komputera wykorzystując program Star Chromatography Workstation, Version 4.0, który służył również do archiwizacji i przetwarzania danych.

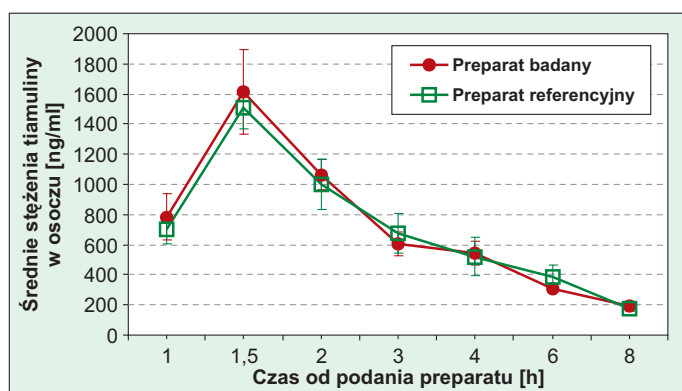
Wartości stężeń tiamuliny w osoczu odczytywano z krzywej kalibracyjnej wyznaczonej w zakresie stężeń od 360 do 3600 ng/ml. Prawdliwość zależności liniowej w pozostałych wartościach stężeń potwierdzono testem istotności korelacji. Obliczono: liniowość, precyzję, dokładność, odzysk oraz granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ).

Analiza farmakokinetyczna. Obliczono wskaźniki farmakokinetyczne tj. AUC, $C_{maks.}$, $t_{maks.}$, $t_{0,5}$, V_d , k_{el} i MRT dla tiamuliny po jej stosowaniu w postaci preparatu Tiamulina 10% i Tiamutin 12,5%. Do obliczeń farmakokinetycznych użyto programu komputerowego PK Solutions 2.0 wykorzystującego metody niekompartmentowej analizy farmakokinetycznej. Model taki pozwala na opisywanie zarówno kinetyki liniowej, jak i nieliniowej (13). To niezależne od modelu podejście do farmakokinetyki opiera się na teorii momentów statystycznych. Zastosowanie tej teorii w badaniach farmakokinetycznych jest możliwe, gdyż zmiany stężenia leku w osoczu, badane jako funkcja czasu, mogą zostać uznane za procesy, które podlegają zasadzie prawdopodobieństwa oraz statystyki (13). Model taki był już wielokrotnie stosowany w badaniach nad farmakokinetyką innych antybiotyków (7). Zastosowana metoda niekompartmentowa jest zalecana także w badaniach mających na celu ocenę biorównoważności produktów leczniczych. Badania biorównoważności opierają się na założeniu, że w sytuacji, w której substancja czynna produktu badanego dociera z taką samą szybkością i w takim samym stopniu do krążenia ogólnego, jak to ma miejsce w przypadku produktu referencyjnego, to dostępność lokalna (stężenie w tkankach) jest podobna dla obu produktów – badanego i referencyjnego (1). Tempo i stopień wchłaniania leku do krążenia ogólnego charakteryzują, odpowiednio, wartości $C_{maks.}$, $t_{maks.}$ oraz AUC (2, 19). W związku z powyższym dla oceny występowania biorównoważności pomiędzy porównywanymi preparatami użyto następujących wskaźników: AUC, $C_{maks.}$ i $t_{maks.}$ (2, 19).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Statistica 6,0. Dla weryfikacji hipotezy równości średnich poszczególnych parametrów farmakokinetycznych przeprowadzono analizę wariancji ($\alpha = 0,05$).

Wyniki i omówienie

Dokładność zastosowanej metody została określona przez odzysk, który był równy 83,5%. Wyznaczono granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wynoszące kolejno: 47,5 ng/ml i 158 ng/ml. Współczynnik korelacji był wysoki i wyniósł $r = 0,9999$. Obliczone wartości parametrów walidacji mieściły się w dopuszczalnym zakresie.



Ryc. 1. Porównanie wartości średnich stężeń tiamuliny w osoczu (ng/ml) kurcząt rzeźnych w zależności od czasu (h) dla obu preparatów (wraz z odchyleniem standardowym)

Średnie stężenia tiamuliny w osoczu kurcząt rzeźnych po stosowaniu preparatów w jednakowej dawce przedstawiono na ryc. 1. Przebieg obu krzywych jest zdecydowanie równoległy, co wskazuje na podobną kinetykę tiamuliny w organizmie ptaków, niezależnie od użytego produktu leczniczego. Odcinek początkowy krzywych (do 1,5 godz. po podaniu leku) obrazuje etap wchłaniania podanej substancji z przewodu pokarmowego do krwi. Najwyższe stężenia tiamuliny po jednorazowym podaniu preparatów obserwowano dosyć szybko, bo już po upływie 1,5 h i wyniosły one, odpowiednio: 1614 ng/ml (Tiamulina 10%) i 1505 ng/ml (Tiamutin 12,5%). Czas wystąpienia stężenia maksymalnego jest zgodny z wynikami uzyskanymi przez innych autorów badających losy tiamuliny u różnych gatunków zwierząt (4, 10) i świadczy o szybkiej absorpcji tiamuliny z przewodu pokarmowego. Dalej krzywe przyjmują charakter zstępujący, co wskazuje

Tab. 1. Średnie wartości wskaźników farmakokinetycznych (wraz z odchyleniem standardowym)

Wskaźnik farmakokinetyczny	Tiamulina 10%	Tiamutin 12,5%
$t_{0,5}$ (h)	2,91 ± 0,76	2,47 ± 0,71
$C_{maks.}$ (ng/ml)	1614 ± 506	1504 ± 239
$t_{maks.}$ (h)	1,5 ± 0	1,5 ± 0
AUC (ng•h/ml)	4430 ± 418	4335 ± 979
MRT (h)	4,6 ± 0,78	4,3 ± 0,46
V_d (l/kg)	6,6 ± 1,91	5,1 ± 2,16
k_{el} (h ⁻¹)	0,25 ± 0,11	0,35 ± 0,16

Tab. 2. Ocena biorównoważności pomiędzy preparatem Tiamulina 10% a lekiem referencyjnym – Tiamutin 12,5%

Analizowane wskaźniki	Lek referencyjny	Lek badany	Różnice w % (± 20%)	Bad./ref.	Istotność różnic
$C_{maks.}$ (ng/ml)	1505	1614	+7,24	1,07	ni
$t_{maks.}$ (h)	1,5	1,5	0	1,00	ni
AUC (ng•h/ml)	4335	4430	-2,19	1,02	ni

Objaśnienie: ni – różnica nieistotna statystycznie; $\alpha = 0,05$

na rozpoczęty proces dystrybucji oraz eliminacji tiamuliny z osocza.

W tab. 1 przedstawiono średnie wartości wskaźników farmakokinetycznych (AUC, $C_{maks.}$, $t_{maks.}$, $t_{0,5}$, V_d , k_{el} i MRT) (wraz z odchyleniem standardowym). Obliczone wartości parametrów farmakokinetycznych dla użytych w badaniach produktów układały się na podobnym poziomie.

Biologiczny okres półtrwania tiamuliny wyznaczony w badaniach własnych był stosunkowo krótki i wyniósł średnio 2,4 i 2,9 h. Podobne wartości ($t_{0,5} - 3,0$ h) uzyskano w badaniach przeprowadzonych na cielętach (4). Po podskórnym podaniu tiamuliny psom w dawkach 25 i 10 mg/kg wyznaczono zdecydowanie dłuższy okres półtrwania wynoszący, odpowiednio, 12,4 h oraz 4,2 h pomimo podania niższej dawki (9).

Podsumowując uzyskane wyniki z analizy farmakokinetycznej należy stwierdzić, że proces wchłaniania badanego antybiotyku z przewodu pokarmowego był bardzo szybki. Wartości $C_{maks.}$ zostały osiągnięte już po upływie 1,5 godziny od podania leków ptakom. Tiamulina była stosunkowo szybko eliminowana z osocza kurcząt, o czym świadczy dosyć krótki biologiczny okres półtrwania i MRT, a także dość wysoka wartość stałej eliminacji. Jak podaje piśmiennictwo, tiamulina ulega dobremu rozmieszczeniu w tkankach (m.in. płucach, błonie śluzowej jelit, wątrobie, nerkach), w których osiąga znacznie wyższe stężenia niż we krwi (4, 20). W kolejnych badaniach przeprowadzonych na cielętach stężenie tiamuliny w nerkach, wątrobie i płucach w jedną godzinę po podaniu dożylnym było 4-7,5 razy wyższe niż w surowicy; wyższy poziom leku stwierdzono również w moczu i żółci (20). Obliczona w badaniach własnych wysoka wartość objętości dystrybucji (V_d ponad 5 oraz 6 l/kg) może być potwierdzeniem tych informacji.

Oceny biorównoważności produktów leczniczych *in vivo* dokonano na podstawie przeprowadzonych badań farmakokinetycznych. Wyniki podsumowujące ocenę biorównoważności preparatów przedstawiono w tab. 2. Oceniane preparaty można uznać za biorównoważne, gdyż stosunek porównywanych par parametrów farmakokinetycznych, wyrażony w wartościach rzeczywistych, mieścił się w granicach 0,80-1,20 – a analiza wariancji nie wykazała pomiędzy nimi statystycznie istotnej różnicy, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Także różnica w procentach pomiędzy porównywalnymi wskaźnikami nie przekraczała dopuszczalnego progu ± 20% (1, 10, 19).

Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej, obejmującej parę wskaźników farmakokinetycznych $t_{maks.}$, $C_{maks.}$, AUC, jak i określenie procentowych różnic pomiędzy nimi, pozwalają uznać produkt leczniczy badany Tiamulina 10% i produkt leczniczy referencyjny Tiamutin 12,5% za biorównoważne. Preparaty te mogą

być używane wymiennie u kur, ponieważ zgodnie z zalecanymi procedurami oceny, mają podobne właściwości farmakokinetyczne.

Piśmiennictwo

1. *Anon.*: Conduct of Bioequivalence Studies in Animals. Directive 81/852/EEC as amended 1993.
2. *Anon.*: Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL, 2000.
3. *Boyd B., Castaner J.*: Retapamulin. *Drugs Fut* 2006, 31, 107-113.
4. *Gatne M. M., Badole P. C., Somkuwar A. P., Ranade V. V.*: Pharmacokinetics of tiamulin in calves after single intramuscular administration. *Indian Vet. J.* 1994, 71, 1148-1149.
5. *Hormazabal V., Yndestad M., Ostensvik O.*: Determination of flunixin and tiamulin hydrogen fumarate in meat and toltrazuril and toltrazurilsulfon in meat and eggs using LC/MS. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 2003, 26, 791-801.
6. *Hunt E.*: Pleuromutilin antibiotic. *Drugs Fut* 2000, 25, 1163-1168.
7. *Kalaiselvi L., Sriranjani D., Ramesh S., Sriram P., Mathuram L. N.*: Pharmacokinetics of ofloxacin in broiler chicken. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2006, 29, 185-189.
8. *Krzek J., Kwiecień A., Starek M., Kierszniewska A., Rzeszutko W.*: Identification and determination of tiamulin, lincomycin and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry. *J. AOAC Intern.* 2000, 83, 1502-1506.
9. *Laber G.*: Investigation of pharmacokinetic parameters of tiamulin after intramuscular and subcutaneous administration in normal dog. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1988, 11, 45-49.
10. *Laber G., Schütze E.*: Blood level studies in chickens, turkey poults and swine with tiamulin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 1977, 12, 1119-1122.
11. *Lykkeberg A. K., Cornett C., Halling-Sorensen B., Hansen S. H.*: Isolation and structural elucidation of tiamulin metabolites formed in liver microsomes of pigs. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2006, 42, 223-231.
12. *Markus J. R., Sherma J.*: Method III. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in complete swine meal feeds. *J. AOAC Intern.* 1993, 76, 449-450.
13. *Martinez M. N.*: Noncompartmental methods of drug characterization: statistical moment theory. *JAVMA* 1998, 213, 974-980.
14. *Moore D. B., Britton N. L., Smallidge R. L., Riter K. L.*: Determination of tiamulin in type C medicated swine feeds using high throughput extraction with LC. *J. AOAC Intern.* 2002, 85, 533-540.
15. *Nozal M. J., Bernal J. L., Martin M. T., Jimenez J. J., Bernal J., Higes M.*: Trace analysis of tiamulin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry detection. *J. Chrom.* 2006, 1116, 102-108.
16. *Poulsen S. M., Karlsson M., Johansson L. B., Vester B.*: The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Mol. Microbiol.* 2001, 41, 1091-1099.
17. *Rodriguez-Comesana M., Cancho-Grande B., Simal-Gandara J.*: Screening method for detecting cross-contamination residues of tiamulin in swine feeds. *J. AOAC Intern.* 2003, 86, 449-451.
18. *Schuhmacher A., Bafundo K. W., Islam K. M., Aupperle H., Glaser R., Schoon H. A., Gropp J. M.*: Tiamulin and semduramicin: Effects of simultaneous administration on performance and health of growing broiler chickens. *Poultry Sci.* 2006, 85, 441-445.
19. *Toutain P. L., Koritz G. D.*: Veterinary drug bioequivalence determination. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1997, 20, 79-90.
20. *Ziv G., Levisohn L., Bar-Moshe B., Bor A., Soback S.*: Clinical pharmacology of tiamulin in ruminants. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1983, 6, 23-32.

Adres autora: dr Małgorzata Pomorska-Mól, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: mpomorska@pulawy.piwet.pl