

## Farmakokinetyka morfiny w endotoksemii z wykorzystaniem modelu zwierzęcego – badanie pilotażowe

### *Morphine pharmacokinetics in endotoxemia using an animal model – a pilot study*

Danuta Szkutnik-Fiedler<sup>1</sup>, Małgorzata Mańkowska<sup>1</sup>, Edmund Grześkowiak<sup>1</sup>,  
Hanna Billert<sup>2</sup>, Tomasz Grabowski<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>2</sup> Klinika Anestezjologii w Położnictwie i Ginekologii, Zakład Anestezjologii Doświadczalnej,  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>3</sup> Polpharma Biologics, Gdańsk

## Streszczenie

**Wstęp.** Wiadomym jest, iż endotoksemia może mieć wpływ na farmakokinetykę wielu leków, w tym opioidów, jakkolwiek brak jest wyczerpujących danych odnośnie morfiny. Dlatego celem niniejszego badania było określenie farmakokinetyki morfiny w endotoksemii z zastosowaniem modelu zwierzęcego. **Material i metody.** W badaniu brało udział 12 królików rasy Nowozelandzkiej białej, obu płci. Króliki przydzielono przez randomizację do grupy kontrolnej (n = 6) lub grupy z endotokseміą (n = 6). Grupie kontrolnej podano morfinę w dawce 3 mg/kg mc. (10-minutowy wlew dożylny). W grupie z endotokseміą infuzja morfiny była poprzedzona jednorazowym dożylnym podaniem lipopolisacharydu *E. coli* 0111: B4 w dawce 50 µg/kg mc. (n = 6). Stężenia morfiny oraz parametry fizjologiczne (puls, saturacja, temperatura ciała) były wyznaczone w odpowiednich punktach czasowych do sześciu godzin od podania morfiny. **Wyniki.** U królików z endotokseміą statystycznie niższe wartości saturacji oraz wyższy puls odnotowano do dwóch godzin od podania morfiny. Temperatury ciała królików z endotokseміą były istotnie wyższe w każdym z punktów czasowych. Parametry biochemiczne mieściły się w zakresie wartości prawidłowych i były porównywalne w obu grupach królików. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (p > 0,05) dla wszystkich wyznaczonych parametrów farmakokinetycznych, jakkolwiek w endotokseміi zaobserwowano nieznacznie zwiększoną wartość stałej szybkości eliminacji ( $k_{el}$ ), co może oznaczać szybszą eliminację morfiny z ustroju, oraz mniejszą wartość objętości dystrybucji ( $V_d$ ). Mniejsza objętość dystrybucji morfiny może być związana ze zmianą stopnia wiązania leku z białkami i/lub zmniejszoną perfuzją tkankową. (*Farm Współ* 2015; 8: 3-14)

**Słowa kluczowe:** morfina, endotoksemia, sepsa, króliki

## Summary

**Background.** It is known, that endotoxemia may change pharmacokinetics of many drugs, including opioids, but no specific data are available for morphine. Therefore, the purpose of this study was to determine the pharmacokinetics of morphine in endotoxemia using an animal model. **Material and methods.** Twelve adult New Zealand White rabbits both sexes were used for the study. Rabbits were randomly allocated to either a control (n = 6) or an endotoxin (n = 6) group. In the control group rabbits received morphine at a dose 3 mg/kg (10-min. intravenous infusion). In the endotoxin group morphine infusion was preceded by the endotoxemia induced with lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 0111: B4) at a dose of 50 µg/kg (single intravenous dose, n = 6). Morphine concentrations and physiological parameters (pulse, oxygen saturation, body temperature) were measured at specific time intervals up to six hours after opioid administration. **Results.** In rabbits with endotoxemia, statistically lower saturation and higher heart rate values during the first two hours after administration of morphine were

observed. Body temperature values in endotoxemic rabbits were statistically higher at each time point. Biochemical parameters remained within normal ranges and were comparable between endotoxemic and control rabbits. All pharmacokinetic parameters of morphine were not significantly different in healthy compared to endotoxemic rabbits ( $p > 0.05$ ). However, in endotoxemia a slightly higher elimination rate constant ( $k_{el}$ ), which could mean faster elimination of morphine, and lower volume of distribution ( $V_d$ ) were noted. A decrease of the distribution volume of morphine might be attributed to altered protein binding and/or a compromised tissue perfusion. (*Farm Współ 2015; 8: 3-14*)

*Keywords: morphine, endotoxemia, sepsis, rabbits*

## Wstęp

Wynikiem rozwoju ogólnoustrojowego zakażenia i stanu zapalnego (endotoksemii, a w dalszym etapie sepsy, czy wstrząsu septycznego) może być niewydolność wielonarządowa, której skutkiem są liczne zaburzenia hemodynamiczne oraz biochemiczne, m.in. zmniejszony przepływ krwi przez tkanki, zwłaszcza wątroby i nerek; zmiany wiązania leków z białkami krwi czy wzrost przepuszczalności naczyń włosowatych. Powyższe zmiany mogą istotnie wpływać na farmakokinetykę stosowanych w tym czasie leków, a ostatecznie na efekt farmakologiczny.

Wyniki badań nad farmakokinetyką leków stosowanych w czasie doświadczalnie wywołanej endotoksemii i sepsy na modelach zwierzęcych (szczury, króliki) dowodzą niejednorodnego wpływu tych stanów patologicznych na procesy dystrybucji, czy metabolizmu [1-11]. Uwarunkowane jest to m.in. właściwościami fizykochemicznymi, czy zastosowaną dawką leków, rodzajem wybranego modelu endotoksemii i szczepu zastosowanego lipopolisacharydu, jak i samą wrażliwością różnych gatunków zwierząt [12].

Morfina – opioid klasyfikowany na III stopniu drabiny analgetycznej jest nadal bardzo powszechnie stosowanym lekiem przeciwbólowym, zwłaszcza u pacjentów wymagających intensywnej opieki medycznej, w tym również u pacjentów z endotoksemią, sepsą czy zespołem ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS Systemic Inflammatory Response Syndrome) [13].

Nieliczne badania dotyczące zmian farmakokinetyki morfiny w czasie zakażenia i stanu zapalnego u ludzi wskazują m.in. na zmniejszenie objętości dystrybucji tego leku w przypadku sepsy, oparzeń czy ciężkich urazów [14-16]. Klirens nerkowy morfiny, a zatem wydalanie leku jest z reguły mniejsze

u pacjentów wymagających mechanicznej wentylacji czy cierpiących na niewydolność serca [17].

Nadal brak jest jednak wyczerpujących informacji na temat ew. konieczności modyfikacji schematów dawkowania tego opioidu w czasie endotoksemii. Dlatego, celem niniejszej pracy było określenie farmakokinetyki morfiny w endotoksemii wywołanej doświadczalnie przez dożylnie, jednorazowe podanie królikom roztworu lipopolisacharydu *E. coli* w dawce 50 µg/kg mc. w porównaniu do królików zdrowych.

## Material i metody

### Substancje i odczynniki

W badaniu wykorzystano z następujących substancji i odczynników: substancja lipopolisacharyd *E. coli* (LPS) 011:B4 (seria L4391), substancja siarczan morfiny (seria 08-D-04 LGC Standards, Polska), iniekcje Morphini sulfas WZF 20 mg/ml (seria 01DR1011 WZF Polfa S.A.), acetonitryl (seria I635191 Merck, Niemcy), diwodorofosforan (V) sodu (seria 03.03/7 CHEMPUR), 85 % kwas ortofosforowy (seria K41857773 Merck, Niemcy), węglan amonu (seria 101129834 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy), metanol (seria I676818.310 Merck, Niemcy), azot sprężony (seria: N2-X50S PRM, Polska), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy), Heparyna WZF 5000 j.m./ml (seria 01BK0311, WZF Polfa S.A.), Morbital (seria 051012, Biowet Puławy, Polska), *aqua pro injectione*, woda ultraczysta oczyszczana w systemie typu SMART-Simplicity firmy MILLIPORE.

### Zgoda na przeprowadzenie badań

Badanie przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (numer pozwolenia 12/2012).

### ▪ Charakterystyka badanych zwierząt

Badania przeprowadzono na królikach rasy Nowozelandzkiej białej obu płci, które podzielono na dwie grupy: grupa I - króliki zdrowe ( $n = 6$ , mc. =  $3,45 \pm 0,31$  kg), grupa II - króliki z doświadczalnie wywołaną endotoksemią poprzez jednorazowe, dożylnie podanie roztworu lipopolisacharydu *E. coli* ( $n = 6$ , mc. =  $3,57 \pm 0,12$  kg).

Przed rozpoczęciem badania przez okres dwóch tygodni zwierzęta były poddane aklimatyzacji do warunków lokalnych. Króliki przebywały w standardowych warunkach temperatury ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i wilgotności powietrza ( $56 - 60\%$ ) z zastosowaniem 12 godz. cyklu dzień/noc. Przed doświadczeniami nie otrzymywały paszy przez 12 godzin. Pozostawiono im natomiast nieograniczony dostęp do wody pitnej.

### ▪ Metodyka badań

Grupa I - króliki zdrowe, 10-min dożylny wlew morfiny.

W trakcie 10-minutowego unieruchomienia zwierzęcia w dybach do żyły brzeżnej ucha został podany roztwór morfiny (MORPHINI SULFAS WZF, *Morphini sulfas* 20 mg/ml, roztwór do wstrzykiwań) w dawce 3 mg/kg mc. Przed podaniem roztwór morfiny rozcieńczono w 18 ml soli fizjologicznej. Lek podano za pomocą pompy infuzyjnej 20/50 duet KWAPISZ z prędkością 90 ml/h.

Grupa II - króliki z endotoksemią, jednorazowe dożylnie podanie roztworu *E. coli* 0111: B4 a następnie 10-min. dożylny wlew morfiny.

Celem wywołania endotoksemii u królików, jedną godzinę przed podaniem morfiny, podano roztwór lipopolisacharydu (*E. coli* 0111:B4; Sigma) w jednorazowej dawce 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mc.

Substancję *E. coli* w ilości 1 mg rozpuszczono w 1 ml soli fizjologicznej, a następnie, odpowiednią objętość tego roztworu (przeliczoną na masę ciała każdego królika) rozpuszczono w 0,5 ml soli fizjologicznej i podawano królikom dożylnie do żyły brzeżnej ucha. Po upływie jednej godziny od podania LPS rozpoczęto 10 minutowy wlew dożylny siarczanu morfiny w dawce 3 mg/kg mc.

W obu etapach badań próbki krwi w ilości 2 ml były pobierane od królików w czasie: 0, 5, 15, 30, 45 minut oraz 1, 2, 3, 4, 6 godzin od momentu podania morfiny, z zachowaniem zasad jałowości. Objętość pobieranej krwi była uzasadniona metodą analityczną. W celu uzupełnienia objętości płynów ustrojowych po każdorazowym pobraniu krwi zwie-

rzętom podawano dożylnie 2 ml roztworu soli fizjologicznej. Następnie pobraną krew wirowano przez 10 min (4000 obr./min) w temp.  $\pm 20^\circ\text{C}$ , oddzielono osocze i przeniesiono je do polipropylenowych probówek Eppendorf'a. Próbkę osocza zamrożono i przechowywano w temp.  $-30^\circ\text{C}$  do momentu wykonania właściwej analizy.

Każdorazowo, przy pobieraniu próbek krwi badanym królikom mierzono puls i saturację wykorzystując pulsoksymetr 3800, Datex-Ohmeda, USA, a za pomocą programu komputerowego Hiperon Pomiar poprzez czujnik doodbytniczy monitorowano temperaturę ciała królików.

Dodatkowo, po zakończeniu badań, od każdego zwierzęcia została pobrana jedna próbka krwi (ok. 5 ml) celem wykonania oznaczeń biochemicznych (AlaT, AspAT, poziom bilirubiny, glukozy, kreatyniny), które wykonano z użyciem aparatu Photometr Pointe Euro.

Bezpośrednio po zakończeniu każdego z etapów doświadczeń została przeprowadzona eutanazja zwierząt przez dożylnie podanie preparatu Morbital (Vetoquinol Biowet sp. z o.o.) w dawce 0.5 ml/kg mc. po poprzedniej premedykacji (ketamina 50 mg/kg mc., domięśniowo i ksylazyna 10 mg/kg mc., domięśniowo).

### ▪ Metodyka oznaczania morfiny w osoczu krwi *Aparatura i odczynniki*

W celu określenia stężeń morfiny w osoczu krwi zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z detekcją UV-VIS z użyciem wysokosprawnego chromatografu cieczowego Waters 2695 z autosamplerem. Oznaczenia wykonano w oparciu o metodę opracowaną przez Szkutnik-Fiedler i wsp. [18] oraz Wood'a i Morris'a [19].

Parametry pracy chromatografu były następujące: detektor Dual  $\lambda$  Absorbance, długość fali  $\lambda = 210$  nm, kolumna XTerra RP-8; 4,6 x 250 mm; 5 $\mu\text{m}$  (Waters, USA), szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min, temperatura rozdziału:  $25^\circ\text{C}$ , faza ruchoma (1000 ml): bufor fosforanowy - acetonitryl (85:15), pH = 3,4; objętość nastrzyku: 100  $\mu\text{l}$ , czas retencji morfiny: 3,6 min, całkowity czas analizy: 12 minut.

Wszystkie pomiary, obliczenia oraz automatyczne integracje powierzchni sygnałów wykonano z zastosowaniem programu Empower Pro. W przypadku, gdy procedura automatycznej integracji dawała nieprawidłowe wyniki dokonywano integracji manualnej.

**Przygotowanie roztworów wzorcowych**

Roztwór podstawowy morfiny 1 mg/ml przygotowano raz w miesiącu i przechowywano w temperaturze 4°C chroniąc od światła.

Roztwory robocze morfiny o stężeniach 1, 10 i 100 µg/ml oraz roztwory do krzywych kalibracyjnych w zakresie stężeń morfiny 100 – 1200 ng/ml przygotowano *ex tempore*.

**Przygotowanie próbek osocza do analizy HPLC**

Badane próbki osocza odmrożono w temperaturze pokojowej i odwirowano. Do 0,9 ml pobranego od królików osocza dodano 0,1 ml węgla amonu o pH 8,8. Próbki biologiczne poddano analizie ekstrakcji w fazie stałej. Kondycjonowanie kolumnienek przeprowadzono poprzez przemycie kolejno metanolem, wodą, węglanem amonu w objętości 1 ml każdy. Następnie naniesiono próbkę osocza i ponownie przemyto kolumnienkę 1 ml węgla amonu. Wymywanie próbki przeprowadzono przy użyciu 1 ml 100% metanolu. Eluent metanolowy odparowano do sucha w strumieniu sprężonego azotu przy temperaturze 48°C w ciągu 20 minut. Suchą pozosta-

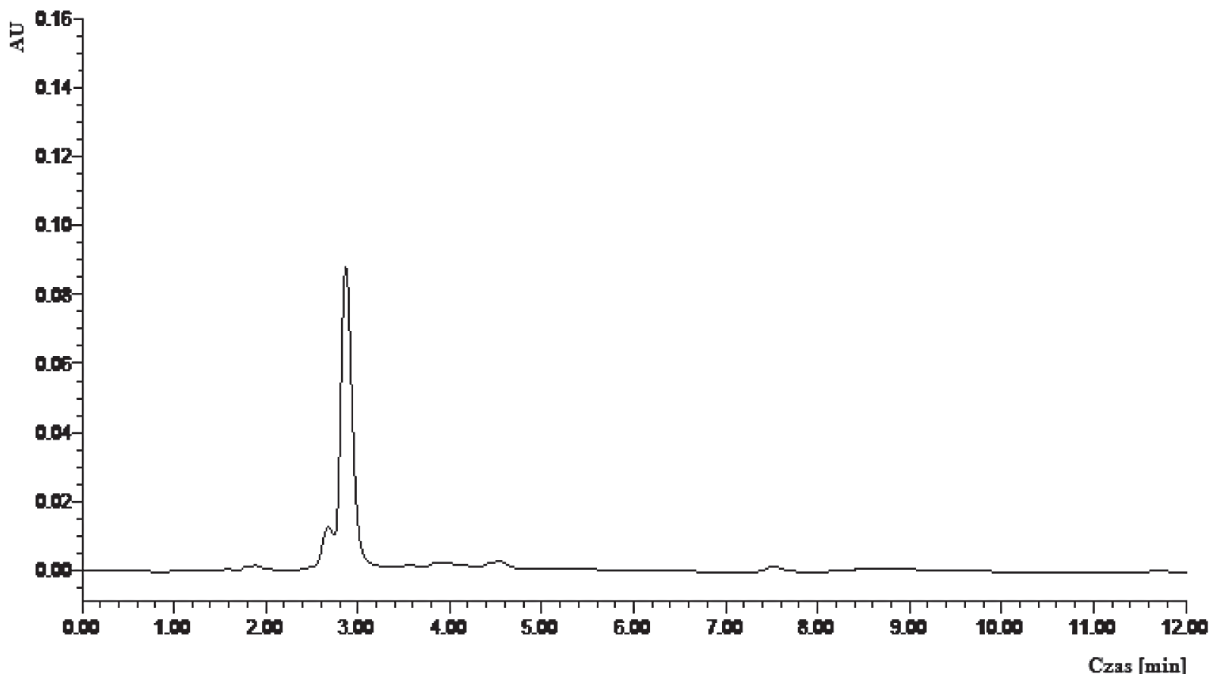
łość rozpuszczono w 120 µl fazy ruchomej, po czym zakręcone korkiem probówki umieszczono na 3 minuty w łaźni wodnej (ok. 35°C). Następnie próbki były wytrząsane przez 10 minut przy prędkości 1000 obr./sekundę. Nadsącz przenoszono do insertów i poddawano analizie chromatograficznej.

**Walidacja metody oznaczania morfiny w osoczu krwi królików**

W celu zwalidowania zastosowanej metody analitycznej oznaczania stężenia morfiny w osoczu krwi wyznaczono następujące parametry: selektywność, liniowość, dokładność oraz precyzję. Walidację metody analitycznej przeprowadzono zgodnie z wytycznymi EMA (ang. *European Medicines Agency*) [20].

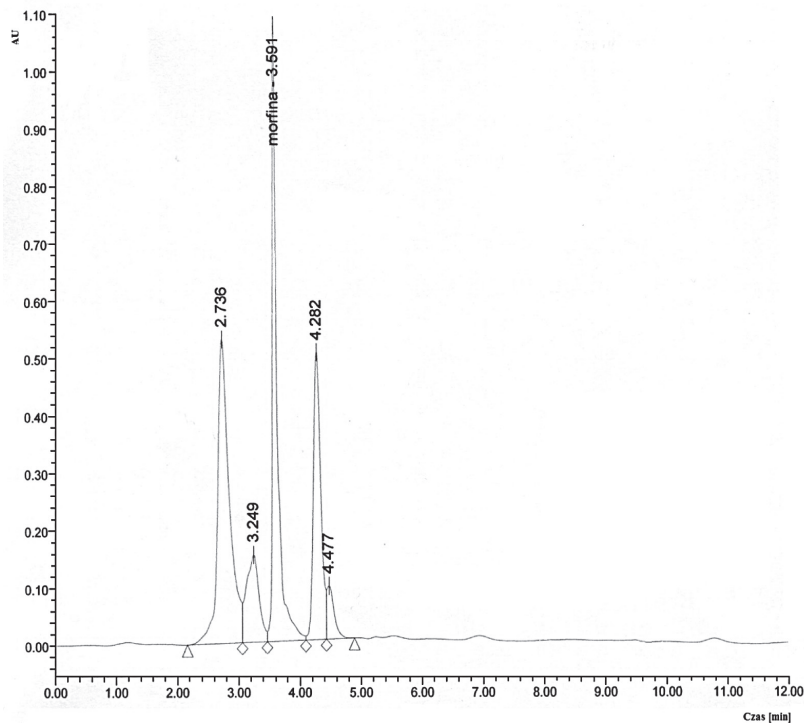
**Selektywność**

Selektywność metody oceniono na podstawie analizy chromatogramów zarejestrowanych dla prób ślepych i prób obciążonych morfiną. Nie stwierdzono interferencji sygnałów morfiny z żadnym z sygnałów odpowiadających składnikom matrycy biologicznej

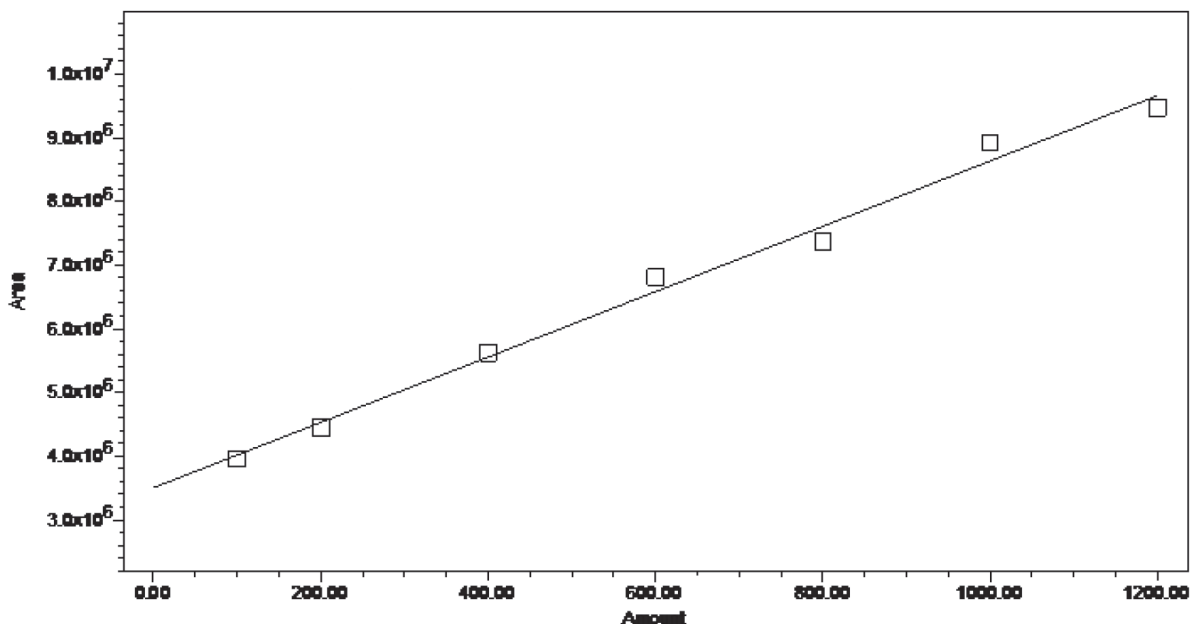


Rycina 1. Przykładowy chromatogram próby ślepej

Figure 1. An example of a chromatogram of the blank sample



Rycina 2. Przykładowy chromatogram próbki osocza królika K12 po 2,0 h od momentu podania morfiny  
 Figure 2. An example of a chromatogram K12 rabbit plasma sample 2.0 hr after administration of morphine



Rycina 3. Średnia krzywa kalibracyjna morfiny (n = 5, r = 0,9954)  
 Figure 3. Standard calibration curve of morphine (n = 5, r = 0.0054)

w warunkach eksperymentalnych (ryciny: 1 i 2).

### Liniowość

W celu określenia liniowości metody analitycznej wyznaczono 5 krzywych kalibracyjnych dla stężeń morfiny: 100, 200, 400, 600, 800, 1000 i 1200 ng/ml.

Uzyskana wartość współczynnika korelacji liniowej  $r = 0,9954$  dla morfiny świadczy o dobrej liniowości metody (rycina 3).

### Precyzja i dokładność

Precyzję i dokładność metody analitycznej do oznaczania stężeń morfiny w osoczu krwi królików wykonano dla stężeń: 100, 300, 600, 900 i 1200 ng/ml (pięć oznaczeń dla każdego stężenia w ciągu jednego oraz trzech kolejnych dni pracy).

Wartości współczynników zmienności  $CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$  dla w/w stężeń były mniejsze niż 15%, co świadczy o tym, iż metoda jest precyzyjna i dokładna.

### Granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LLOQ)

Wartość granicy wykrywalności dla siarczanu morfiny wynosiła 50 ng/ml, natomiast wartość dolnej granicy oznaczalności 100 ng/ml.

### Analiza farmakokinetyczna

Obliczenia parametrów farmakokinetycznych morfiny zostały wykonane w oparciu o założenia farmakokinetyki bezmodelowej.

Na podstawie otrzymanych wartości stężeń morfiny wyznaczono następujące parametry farmakokinetyczne: pole powierzchni pod krzywą zależności zmian stężenia leku we krwi od czasu od zera do nieskończoności ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) oraz od zera do ostatniego zmierzonego stężenia ( $AUC_{0 \rightarrow t}$ ), pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), MRT – średni czas przebywania leku w ustroju [h],  $k_{el}$  – stała szybkości eliminacji [ $h^{-1}$ ],  $t_{0,5}$  – biologiczny okres półtrwania [h], Cl – klirens [l/h],  $V_d$  – objętość dystrybucji [l].

Do obliczeń farmakokinetycznych wykorzystano program Phoenix<sup>TM</sup> 6.0 WinNonlin®, w którym poszczególne parametry zostały wyznaczone według następujących wzorów:

- pole powierzchni pod krzywą zależności zmian stężenia leku we krwi od czasu od zera do nieskończoności ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ):

- pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ):
- średni czas przebywania leku w ustroju:
- biologiczny okres półtrwania ( $t_{0,5}$ ):
- klirens (Cl):
- objętość dystrybucji ( $V_d$ ):

gdzie:

$AUC_t$  – pole powierzchni pod krzywą zależności

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_t + \frac{C_{last}}{k_{el}}$$

zmian stężenia leku we krwi od czasu od zera do ostatniego zmierzonego stężenia

$$AUMC_{0 \rightarrow \infty} = AUMC_t + \frac{t_{last} \cdot C_{last}}{k_{el}} + \frac{C_{last}}{k_{el}^2}$$

$C_{last}$  – ostatnie zmierzone stężenie

$$MRT = \frac{AUMC_{0 \rightarrow \infty}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}}$$

$t_{last}$  – czas, w którym zostało zmierzone ostatnie

$$t_{0,5} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$$

stężenie

$$Cl = \frac{D_{i.v.}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}}$$

$k_{el}$  – stała szybkości eliminacji

$$V_d = \frac{D_{i.v.}}{k_{el} \cdot AUC_{0 \rightarrow \infty}} = \frac{Cl}{k_{el}}$$

$AUMC_{0 \rightarrow \infty}$  – pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej od zera do nieskończoności

$AUMC_t$  – pole powierzchni pod pierwszym momentem krzywej od zera do ostatniego zmierzonego stężenia

$D_{i.v.}$  – dawka leku podanego dożylnie.

### Analiza statystyczna

Analizie statystycznej poddano otrzymane wartości stężeń morfiny w osoczu królików zdrowych (grupa I) i królików z wywołaną endotoksemią (grupa II), parametry farmakokinetyczne morfiny, temperaturę ciała, średnie wartości saturacji i pulsu oraz wyniki badań biochemicznych. Dla każdej z grup zostały obliczone: średnia arytmetyczna (S), odchylenie

nie standardowe (SD), mediana oraz wartości minimalne i maksymalne. Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono w programie Statistica PL 10 (StatSoft, Inc.) w oparciu o test t- Studenta dla zmiennych niepowiązanych oraz w przypadku braku normalności rozkładu, w oparciu o test nieparametryczny U Manna-Whitney'a.

Test Shapiro-Wilk'a posłużył do sprawdzenia czy analizowane dane posiadają rozkład normalny.

## Omówienie wyników i dyskusja

Praca miała na celu ocenę parametrów farmakokinetycznych morfiny u królików w warunkach doświadczalnie wywołanej endotoksemii w porównaniu do królików zdrowych. Wybór dawek morfiny (3 mg/kg mc.) oraz lipopolisacharydu *E. coli* (50 µg/kg mc.) został oparty na podstawie dostępnego piśmiennictwa [21-24].

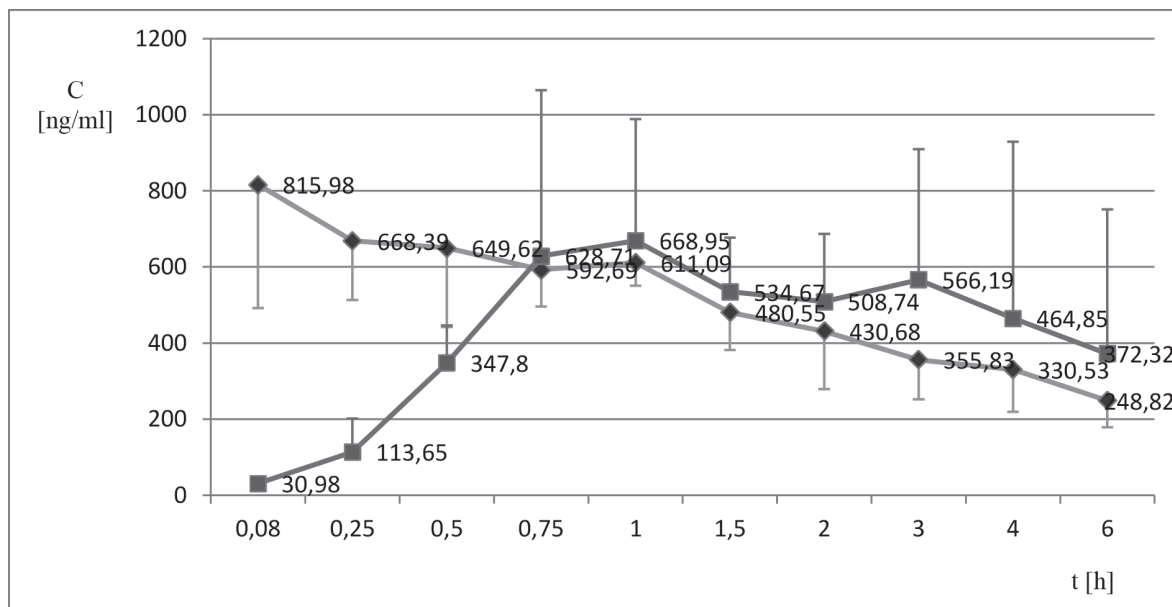
### ▪ Działania niepożądane

W żadnej z obu grup nie zaobserwowano poważnych działań niepożądanych. Jedynie w pierwszej godzinie od podania morfiny u kilku królików z obu grup zaobserwowano sedację oraz ślinotok.

### ▪ Stężenia morfiny w osoczu krwi

Analiza statystyczna wartości stężeń morfiny u badanych królików wykazała różnice istotne statystycznie w początkowych punktach czasowych: 0,08; 0,25 i 0,05 h ( $p < 0,01$ ), przy czym u królików z endotoksemią stężenia morfiny były istotnie mniejsze. Porównanie zależności zmian średnich stężeń morfiny w czasie  $c = f(t)$  w osoczu krwi królików zdrowych i królików z wywołaną endotoksemią przedstawiono na rycinie 4.

Porównując otrzymane wyniki do badań nad innymi lekami, Yang i wsp. [12] wykazał np., że w czasie sepsy w pierwszej godzinie od podania amikacyny, tobramycyny, netylmycyny oraz cefalotyny,



Rycina 4. Porównanie zależności zmian średnich stężeń morfiny w czasie  $c = f(t)$  w osoczu krwi królików zdrowych i z endotoksemią

Różnice istotne statystycznie zaobserwowano w następujących punktach czasowych: 0,08 h ( $p < 0,01$ ); 0,25 h ( $p < 0,01$ ) i 0,5 h ( $p < 0,01$ ); ◆ – króliki zdrowe; ■ – króliki z endotoksemią

Figure 4. Mean plasma concentration-time profiles of morphine in healthy and endotoxemic rabbits

Significant differences were observed at the following time points: 0.08 h ( $p < 0.01$ ); 0.25 h ( $p < 0.01$ ) and 0.5 h ( $p < 0.01$ )  
◆ – healthy rabbits, ■ – rabbits with endotoxemia

stężenia tych antybiotyków były większe, a po 3 h – mniejsze w porównaniu do królików zdrowych.

#### ▪ Parametry farmakokinetyczne

Porównując parametry farmakokinetyczne morfiny u królików zdrowych i z endotoksemią nie wykazano różnic istotnych statystycznie ( $p > 0,05$ ) (tabela I). U królików z endotoksemią odnotowano jedynie nieznaczny (o 37,38%) wzrost stałej szybkości eliminacji ( $k_{el} = 0,13 \pm 0,03$  vs.  $0,21 \pm 0,15$  h<sup>-1</sup>) oraz niewielkie zwiększenie całkowitego klirensu nerkowego ( $Cl = 0,40 \pm 0,09$  vs.  $0,49 \pm 0,35$  l/h), odpowiednio u królików zdrowych i z endotoksemią. Może to wskazywać na nieco zwiększoną eliminację morfiny w czasie endotoksemii. U królików z endotoksemią odnotowano nieco mniejszą objętość dystrybucji, co mogło być wynikiem zakażenia i upośledzonej perfuzji tkanek. Podobne wyniki, tj. mniejszą wartość objętości dystrybucji morfiny, zaobserwowano również w badaniach klinicznych u pacjentów krytycznie chorych [14-16]. Mniejsze wartości objętości dystrybucji z wykorzystaniem zwierzęcego modelu sepsy otrzymano również dla np. feksofenadyny [2] czy propo-

folu [7].

Porównując obie grupy królików, nie stwierdzono także różnic istotnych statystycznie dla ilości leku wchłoniętego do krążenia ogólnego ( $AUC_{0-\infty}$  oraz  $AUC_{0-t}$ ) ( $p > 0,05$ ). Podobne wyniki uzyskał np. Ahmad M. i wsp. [1] badając farmakokinetykę ofloksacyliny u królików z sepsą, czy Jaisue i wsp. oceniając farmakokinetykę feksofenadyny po podaniu LPS u szczurów [2].

Znaczne wartości odchyłeń standardowych dla otrzymanych wartości stężeń i parametrów farmakokinetycznych morfiny mogą świadczyć o występowaniu dużych różnic międzyosobniczych wśród badanych królików, co jednak jest zjawiskiem dość częstym w badaniach na zwierzętach [1-9].

Porównując wyniki badań na zwierzętach nad farmakokinetyką różnych leków, zaobserwowano, że ewentualne zmiany procesów farmakokinetycznych w czasie endotoksemii czy sepsy nie są identyczne. Uwarunkowane jest to m.in. właściwościami fizykochemicznymi i dawką leku, rodzajem zastosowanego modelu stanu zapalnego i zakażenia (rodzaj, dawka

Tabela I. Parametry farmakokinetyczne morfiny u królików zdrowych i z endotoksemią  
Table I. The pharmacokinetic parameters of morphine in healthy and endotoxemic rabbits

Parametr	Króliki zdrowe (n = 6)				Króliki z endotoksemią (n = 6)				Ocena statystyczna (test t-Studenta)
	S ± SD	mediana	min	maks	S ± SD	mediana	min	maks	
AUC <sub>0-t</sub> [ng x h/ml]	2482,48 ± 501,07	2448,85	1936,06	3187,01	2740,36 ± 1245,41	2605,01	1338,28	5024,42	NS
AUC <sub>0-∞</sub> [ng x h/ml]	4460,38 ± 912,45	4446,06	3423,16	5552,24	3289,36 ± 1341,39	3472,35	1168,46	4621,47	NS*
t <sub>0,5</sub> [h]	5,59 ± 1,21	5,51	4,08	7,29	5,54 ± 3,93	5,20	1,54	11,62	NS
MRT [h]	7,62 ± 1,59	7,70	5,87	10,07	8,61 ± 6,13	7,46	3,25	18,73	NS
K <sub>el</sub> [h <sup>-1</sup> ]	0,13 ± 0,03	0,13	0,10	0,17	0,21 ± 0,15	0,16	0,06	0,45	NS
Cl [l/h]	0,40 ± 0,09	0,39	0,31	0,55	0,49 ± 0,35	0,44	0,07	1,05	NS
V <sub>d</sub> [l]	6,69 ± 2,07	5,46	3,44	10,23	4,98 ± 1,50	3,60	2,67	8,35	NS

\* test U Manna-Whitney'a

S – średnia arytmetyczna

SD – odchylenie standardowe

min – wartość minimalna

maks – wartość maksymalna

NS – różnice nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ )



i droga podania szczepu LPS, wybór gatunku zwierząt) [1-12].

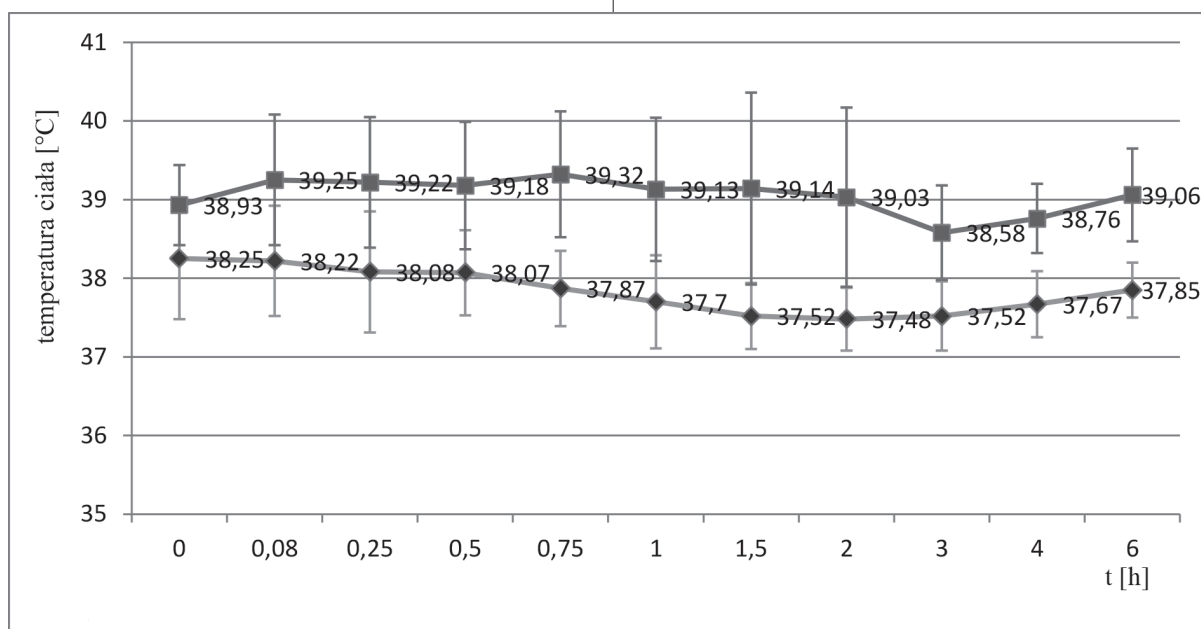
#### Parametry biochemiczne

Morfina jest lekiem metabolizowanym głównie w wątrobie i wydalany przez nerki w 90%, w związku z czym zmniejszenie ukrwienia tych narządów, które obserwuje się w czasie rozwoju ostrego stanu zapalnego, może zmniejszać metabolizm i wydalanie tego opioidu. W przeprowadzonym badaniu, oceniając markery wydolności wątroby i nerek: ALAT, AspAT, bilirubinę oraz kreatyninę nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Pomimo tego, można zauważyć nieznaczny wzrost każdego z tych parametrów u królików z endotoksemią (tabela II). Wg Melillio A. [25] oraz Gil i wsp. [26] otrzymane wartości parametrów biochemicznych u królików zdrowych i z endotoksemią były w granicach normy.

#### Zmiany fizjologiczne

Celem określenia zmian fizjologicznych u królików po podaniu morfiny dokonywano pomiarów temperatury ciała, mierzono również puls i saturację w każdym punkcie czasowym pobierania próbek krwi. W porównaniu do królików zdrowych wartości temperatury ciała zwierząt, które otrzymały LPS były statystycznie wyższe ( $p < 0,05$ ) w każdym punkcie czasowym (rycina 5). Potwierdzają to wyniki badań nad farmakokinetyką innych leków po podaniu LPS [21,27,28].

Saturacja w ciężkim zakażeniu jest na ogół niższa, a wartości pulsu wyższe w porównaniu do wartości prawidłowych [10,29]. U królików z endotoksemią statystycznie niższe wartości saturacji obserwowano w punktach czasowych: 0,08 oraz 0,25 h, natomiast statystycznie wyższe wartości pulsu, w punktach czasowych: 0,08; 0,50; 0,75; 1,0 oraz 2,0 h (rycina 6).

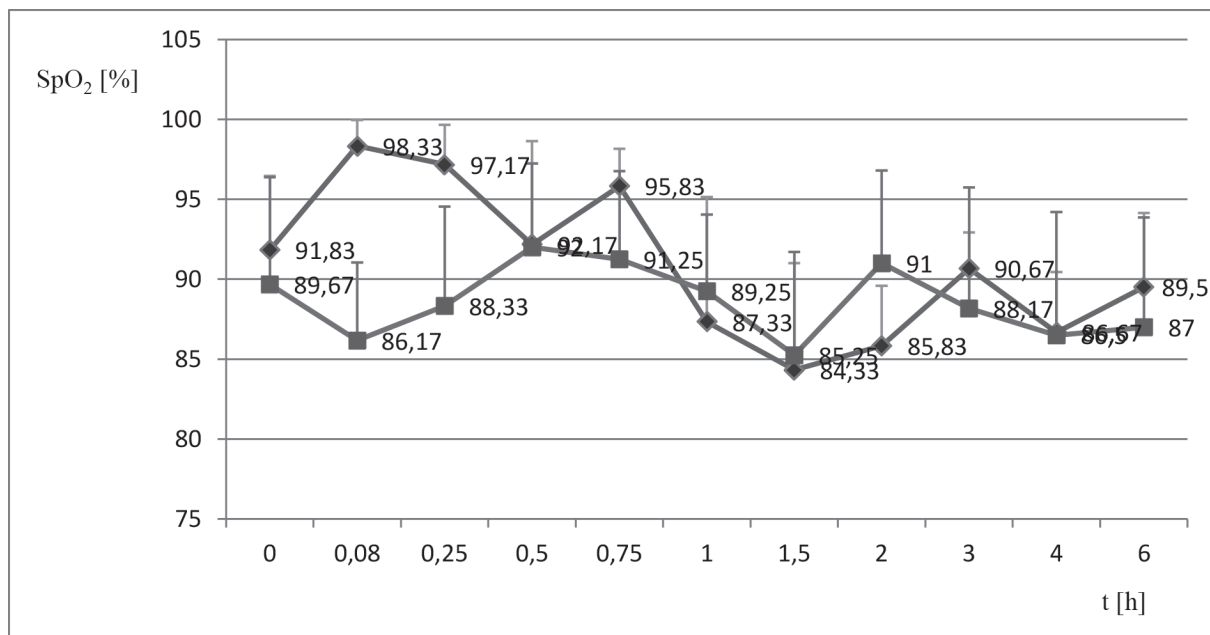


Rycina 5. Porównanie zmian średnich wartości temperatury ciała u królików zdrowych i z endotoksemią. Różnice istotne statystycznie zaobserwowano dla wszystkich punktów czasowych ( $p < 0,05$ ); ◆ – króliki zdrowe; ■ – króliki z endotoksemią

Figure 5. Comparison of changes in mean body temperature of healthy and endotoxemic rabbits

Significant differences were observed at the following time points: 0.08 h ( $p < 0,05$ )

◆ – healthy rabbits, ■ – rabbits with endotoxemia



Rycina 6. Porównanie zmian średnich wartości saturacji (SpO2) u królików zdrowych i z endotokseią  
 Różnice istotne statystycznie zaobserwowano w następujących punktach czasowych: 0,08 h (p < 0,001) i 0,25 h (p = 0,0089);  
 ◆ – króliki zdrowe; ■ – króliki z endotokseią

Figure 6. Comparison of changes in mean values of saturation (SpO2) in healthy and endotoxemic rabbits  
 Significant differences were observed at the following time points: 0.08 h (p < 0.001) and 0.25 h (p = 0.0089)  
 ◆ – króliki zdrowe; ■ – króliki z endotokseią

Tabela II. Parametry biochemiczne u królików zdrowych i z endotokseią  
 Table II. Biochemical parameters in healthy and endotoxemic rabbits

Parametr	Króliki zdrowe (n = 6)				Króliki z endotokseią (n = 6)				Ocena statystyczna (test t-Studenta)
	S ± SD	mediana	min	maks	S ± SD	mediana	min	maks	
AIAT (IU/l)	46,42 ± 20,27	41,9	29,7	78,5	53,13 ± 32,49	40,7	30,1	101,0	NS
AspAT (IU/l)	57,94 ± 58,45	34,9	26,2	162,3	70,85 ± 44,38	55,75	37,9	134,0	NS*
Glukoza (mg/dl)	140,84 ± 34,59	129,2	103,7	194,2	96,73 ± 17,77	99,0	74,9	114,0	NS
Kreatynina (mg/dl)	2,00 ± 0,65	2,00	1,10	2,80	2,15 ± 0,43	2,08	1,73	2,71	NS
Bilirubina (mg/dl)	< 0,5				< 0,5				–

\* test U Manna-Whitney'a

S – średnia arytmetyczna

SD – odchylenie standardowe

min – wartość minimalna

maks – wartość maksymalna

NS – różnice nieistotne statystycznie (p > 0,05)

## Podsumowanie

Reasumując, w warunkach doświadczalnie wywołanej endotoksemii u królików, eliminacja morfiny była nieznacznie zwiększona, jednakże nie było to związane ze zmniejszeniem dostępności biologicznej tego leku. Zaobserwowana w badaniu, mniejsza wartość objętości dystrybucji morfiny u królików z endotoksemią mogła być spowodowana upośledzoną perfuzją, która jest wynikiem rozwoju zakażenia [7,30].

Koniecznym wydaje się kontynuacja badań nad farmakokinetyką morfiny w endotoksemii z zastosowaniem różnych dawek czy dróg podania szczepu *E. coli*, co pozwoliłoby na wykazanie ew. wpływu w/w stanu patologicznego na procesy, jakim podlega ten opioid w organizmie.

Zaobserwowane w niniejszym badaniu pilotażowym zmiany w farmakokinetyce morfiny podczas

endotoksemii u królików mogą być rozważane przy określaniu schematów dawkowania tego leku u ludzi. Jednakże, wyniki te nie mogą być odniesione bezpośrednio, ze względu na istotne różnice fizjologiczne u ludzi i królików uzależnione m.in. od zmian: ciśnienia onkotycznego, perfuzji tkankowej, przepuszczalności naczyń krwionośnych czy stopnia wiązania leku z białkami krwi [24,31].

## Konflikt interesów

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Danuta Szkutnik-Fiedler

Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji  
ul. Św. Marii Magdaleny 14; 61-861 Poznań

☎ (+48 61) 668 78 53

✉ d.szkutnik@wp.pl

## Piśmiennictwo

- Ahmad M, Raza H, Murtaza G i wsp. Pharmacokinetics variations of ofloxacin in normal and febrile rabbits. *Pakistan Vet J* 2008;28(4): 181-5.
- Jaisue S, Gerber JP, Davey AK. Pharmacokinetics of fexofenadine following LPS administration to rats. *Xenobiotica* 2010;40(11):743-50.
- Haghgoo S, Hasegawa T, Nadai M i wsp. Effect of a bacterial lipopolysaccharide on biliary excretion of a b-lactam antibiotic, cefoperazone, in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39(10):2258-61.
- Kato R, Fujiwara A, Kawai T i wsp. Changes in Digoxin Pharmacokinetics Treated with Lipopolysaccharide in Wistar Rats. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1221-5.
- Kumar R, Malik JK. Influence of endotoxin on the disposition kinetics and dosage regimens of oxytetracycline in calves. *J Vet Pharmacol Ther* 2003;26:159-64.
- Marrier JF, Beaudry F, Ducharme MP i wsp. A pharmacokinetics study of amoxicillin in febrile beagle dogs following repeated administrations of endotoxin. *J Vet Pharmacol Ther* 2001;24:379-83.
- De Paepe P, Belpaire FM, Van Hoey G i wsp. The influence of endotoxemia on the pharmacokinetics and the electroencephalographic effect of propofol in the rat. *J Pharm Sci* 2003;92:104-14.
- Post LO, Cope CV, Farrell DE i wsp. Influence of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and dexamethasone on the pharmacokinetic parameters of enrofloxacin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:217-22.
- Sermsappasuk P, Abdelrahman O, Weiss M. Cardiac pharmacokinetics and inotropic response of verapamil in rats with endotoxemia. *J Pharm Sci* 2008;97(7):2798-804.
- Sarwari AR, Mackowiak PA. The pharmacologic consequences of fever. *Infect Dis Clin North Am* 1996;10:21-32.
- Waxman S, San Andres MD, Gonzalez F i wsp. Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced fever on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *J Vet Pharmacol Therap* 2003;26:65-9.
- Yang KH, Lee MG. Effects of Endotoxin Derived from *Escherichia coli* Lipopolysaccharide on the Pharmacokinetics of Drugs. *Arch Pharm Res* 2008;31(9):1073-86.
- Kotlińska-Lemieszek A, Bączyk E, Ciałkowska-Rysz A, i wsp. Morfina w leczeniu bólu u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową. Czy dobrze znamy ten lek? Jak go bezpiecznie stosować? *Med Paliat* 2010;2:67-80.
- Berkenstadt H, Mayan H, Segal E i wsp. The pharmacokinetics of morphine and lidocaine in nine severe trauma patients. *J Clin Anesth* 1999;11:630-4.
- Berkenstadt H, Segal E, Mayan H i wsp. The pharmacokinetics of morphine and lidocaine in critically ill patients. *Intensive Care Med* 1999;25:110-2.
- Christie J, Markowsky SJ, Valdes C. Acute trauma alter morphine clearance. *J Trauma* 1995;39:749-52.

17. Peters JW, Anderson BJ, Simons SH i wsp. Morphine pharmacokinetics during venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in neonates. *Intensive Care Med* 2005;31:257-63.
18. Szkutnik-Fiedler D, Grześkowiak E, Gaca M. HPLC-UV determination of morphine in human plasma and its application to the clinical study. *Acta Pol Pharm* 2011;68:473-9.
19. Wood M, Morris M. Quantification of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in biological samples by LC/MS/MS. Waters Corporation, Manchester, UK [online] 2007. [dostęp: 06.05.2013]. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001546en.pdf>.
20. Guideline on bioanalytical method validation. Wytyczne European Medicines Agency z 21.07.2011, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
21. Elmas M, Yazar E, Uney K i wsp. Pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine and interactions between both drugs after intravenous co-administration in healthy and endotoxaemic rabbits. *Vet J* 2008;177(3):418-24.
22. Hu OY, Ho ST, Wang JJ i wsp. Paw pressure test in the rabbit: a new animal model for the study of pain. *Acta Anaesthesiol Sin* 1996;34(1):1-8.
23. Liaw WJ, Ho ST, Wang JJ i wsp. Determination of morphine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;714(2):237-245.
24. Popov D, Pavlov G. Sepsis model in experimental animals. *Trakia J Sci* 2013;1:12-23.
25. Melillo A. Rabbit clinical pathology. *J Exotic Pet Med* 2007;16:3135-45.
26. Gil AG, Silván G, Villa A i wsp. Serum biochemical response to inhalant anesthetics in New Zealand white rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010;49:52-6.
27. Celik I, Akbulut A, Kilic SS i wsp. Effects of Ibuprofen on the physiology and outcome of rabbit endotoxic shock. *BMC Infectious Diseases* 2002;2:26.
28. Elmas M, Yazar E, Uney K, et al. Influence of Escherichia coli endotoxin-induced endotoxaemia on the pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous administration in rabbits. *Zentralbl Veterinarmed A* 2006;53 (8):410-4.
29. Alamili M, Rosenberg J, Gögenur I. Day-night variation in heart rate variability changes induced by endotoxaemia in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2015;59(4):457-64.
30. Szkutnik-Fiedler D, Prus J, Grześkowiak E. Sepsa – podstawowe informacje dla farmaceutów. *Gaz Farm* 2013;2(250):26-8.
31. Dyson A, Mervyn Singer M. Animal models of sepsis: Why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009;37(1):30-7.