

AUTOREFERAT

dr n. wet. Beata Łebkowska-Wieruszewska

*Zakład Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

1. Imię i nazwisko

Beata Łebkowska-Wieruszewska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

1999-2005 tytuł zawodowy lekarza weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie

2005-2009 stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Różnice w wartościach stężeń sulfachloropirazyny w tkankach kurcząt i indyków oznaczonych techniką HPLC w aspekcie wyznaczenia okresu karencji.*

Promotor: prof. dr hab. Cezary J. Kowalski

Recenzenci: prof. dr hab. Jacek Roliński, prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

2014-2015 tytuł zawodowy specjalisty z zakresu chorób psów i kotów, Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego, Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

2005 - 2009 doktorant w Zakładzie Farmakologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

2009-2010 asystent w Zakładzie Farmakologii, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

2010 - do chwili obecnej – adiunkt w Zakładzie Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r. poz. 1789 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Ocena profilu farmakokinetycznego wybranych leków przeciwbólowych u zwierząt towarzyszących”.

składa się z jednotematycznego cyklu pięciu publikacji oryginalnych z listy A bazy JCR.

4.1.1.

Łebkowska-Wieruszewska B., Barsotti G., Lisowski A., Gazzano A., Owen H., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetics and estimated bioavailability of grapiprant, a novel selective prostaglandin E₂ receptor antagonist, after oral administration in fasted and fed dogs. *New Zealand Veterinary Journal* 65:19-23. DOI: 10.1080/00480169.2016.1241727

(MNiSW2016 = 30; IF2017 = 1,529)

Mój udział (80%) obejmował opracowanie koncepcji i planu badań, przeprowadzenie doświadczenia, analizę chromatograficzną, analizę farmakokinetyczną, interpretację wyników oraz redakcję manuskryptu.

4.1.2.

Łebkowska-Wieruszewska B., De Vito V., Owen H., Poapolathep A., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetics of grapiprant a selective EP₄ prostaglandin PGE₂ receptor antagonist after 2 mg/kg oral and IV administrations in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:11-15. DOI: 10.1111/jvp.12414

(MNiSW2016 = 25; IF2017 = 1,441)

Mój udział (85%) obejmował opracowanie koncepcji i planu doświadczenia, przeprowadzenie doświadczenia, analizę chromatograficzną, analizę farmakokinetyczną, interpretację wyników oraz redakcję manuskryptu.

4.1.3.

Łebkowska-Wieruszewska B., Kim TW., Chea B., Owen H., Poapolathep A., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetic profiles of the two major active metabolites of metamizole (dipyrone) in cats

following three different routes of administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41:334–339. DOI: 10.1111/jvp.12471

(MNiSW2016 = 25; IF2017 = 1,441)

Mój udział (70%) obejmował przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie analiz materiału badawczego, analizę i interpretację wyników oraz redakcję manuskryptu.

4.1.4.

Giorgi M., Lebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Owen H., Poapolathep A., Kim T.W., De Vito V. (2018) Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites after four different routes of administration in healthy dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41:428-436. DOI: 10.1111/jvp.12484

(MNiSW2016 = 25; IF2017 = 1,441)

Mój udział (55%) obejmował opracowanie koncepcji i planu badań, przeprowadzenie doświadczenia, analizę i interpretację wyników oraz redakcję manuskryptu.

4.1.5.

Lebkowska-Wieruszewska B., De Vito V., Kowalski C.J., Owen H., Poapolathep A., Lisowski A., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetic profiles of 5 mg/kg ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor, orally administered to dogs in fasted and non-fasted states. A preliminary study. *Polish Journal of Veterinary Science* 21:281-285. DOI: 10.24425/119049

(MNiSW2016 = 20; IF2017 = 0,839)

Mój udział (82%) obejmował opracowanie koncepcji i planu badań, przeprowadzenie doświadczenia, analizę chromatograficzną, analizę farmakokinetyczną, analizę i interpretację wyników, redakcję manuskryptu i korespondencję z czasopismem.

Łączny współczynnik wpływu (*impact factor*) prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji (dla prac opublikowanych w roku 2018 przyjęto wskaźnik z roku 2017) wynosi: **6,691** a suma punktów wg listy czasopism punktowanych MNiSW (dla prac opublikowanych w roku 2018 i 2017 przyjęto ostatni dostępny wskaźnik z roku 2016) wynosi: **125**.

Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się odpowiednio w załącznikach (4 i 5) do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

4.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Nowoczesne spojrzenie na ból ocenia go w znacznie szerszych kategoriach niż tylko proste odbieranie bodźców uszkodzających tkanki, ponieważ uwzględnia również czynnik emocjonalny. Choć procesy neurofizjologiczne związane z odczuwaniem bólu mają taki sam przebieg, zwierzęta zwykle ukrywają ból, gdyż ból oznacza słabość i zmniejsza szanse przetrwania. Ból więc istnieje ale nie jest manifestowany, a weterynaryjni pacjenci często cierpią w „ciszy”. Czynnik emocjonalny w przypadku zwierząt dodatkowo nasila odczuwanie bólu, gdyż często sama obecność w gabinecie weterynaryjnym może powodować silny stres czy stan depresyjny a zarazem przedłużać lub nawet uniemożliwiać rekonwalescencję.

W ostatnich latach powstały międzynarodowe organizacje zajmujące się zagadnieniami potrzeby leczenia bólu u zwierząt, takie jak: International Veterinary Academy of Pain Management (IVAPM). Ta świadomość konieczności zastosowania analgetyków spowodowała, że również weterynaryjny rynek leków przeciwbólowych stale się rozszerza (Toutain i Lees, 2004). Jest to także związane z rosnącym zapotrzebowaniem w starzejącej się grupie zwierząt towarzyszących. Wraz z rozwojem nowoczesnych technik diagnostycznych oraz możliwości leczenia, pacjenci geriatryczni żyją coraz dłużej. Jednocześnie są bardziej podatni na choroby związane z wiekiem – nowotwory, zapalenie stawów, zaburzenia metaboliczne, otyłość itp. Większość, jeśli nie wszystkie te choroby są związane z bólem i stanem zapalnym. Często ból staje się nieodłącznym towarzyszem podeszłego wieku, co jest zupełnie niepotrzebne i może on być bezpiecznie eliminowany.

Uwaga klinicystów jest również ukierunkowana na leczenie ostrego bólu z powodu urazu lub zabiegu chirurgicznego. Chirurgia weterynaryjna wprowadza coraz więcej nowych technik operacyjnych, zwiększających liczbę pacjentów, którzy powinni zostać objęci terapią przeciwbólową głównie w okresie okołoperacyjnym.

Ze względu na ostatnio zwiększone zainteresowanie dobrostanem zwierząt, również metody i schematy terapii bólu zostały poddane dokładnej analizie. Pomimo, że najnowsze leki przeciwbólowe są szeroko dostępne w medycynie ludzkiej, liczba leków aktualnie zarejestrowanych do użytku w weterynarii jest nadal bardzo mała. Jednocześnie obserwuje się powszechną tendencję wśród praktykujących lekarzy weterynarii do stosowania leków przeciwbólowych poza wskazaniami (*off - label use*) dla danego gatunku zwierząt. Przyczyną takiego działania jest chęć zapewnienia tzw. „komfortu chorowania” głównie u pacjentów gatunków towarzyszących, które nieczęsto, jak to ma miejsce w przypadku kotów, manifestują cierpienie, ze względu na spokojny charakter i subtelną ekspresję bólu. Taki schemat postępowania obarczony jest jednak działaniami niepożądanymi, związanymi z niedostosowaną dawką i interwałami podawania, bądź brakiem wystąpienia efektu terapeutycznego podważającego zasadność stosowania danego leku przeciwbólowego.

Weterynaryjnych pacjentów charakteryzuje inny styl życia, czyniąc je bardziej odpowiednimi modelami zwierzęcymi niż wiele tradycyjnych zwierząt laboratoryjnych, które mogą mieć całkiem inne profile lekooporności niż spotykane u ludzi (Giorgi, 2012). Co więcej, ekstrapolacja dawki z ludzi na zwierzęta, a nawet pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt jest niepoprawna, ponieważ w farmakokinetyce leków, wykazano wiele różnic specyficznych gatunkowo. Przykładowo diametralne różnice napotkano w profilach farmakokinetycznych psów i kotów po podaniu leków przeciwbólowych jak tramadol, tapentadol czy flupirtyna (Giorgi, 2010; Lee, 2013; De Vito, 2014

i 2015a). Szereg opisanych działań niepożądanych może być zatem związanych właśnie z nieodpowiednim dostosowaniem dawki dla danego gatunku a nawet samej drogi padania, która zmienia kinetykę leku a następnie modyfikuje efekt końcowy działania i poziom skuteczności leczenia. Co więcej, producenci nie informują o tym, czy leki należy podawać na czczo, czy po karmieniu, co z punktu widzenia farmakokinetyki może bezpośrednio wpływać na skuteczność leczenia bólu (Kim i wsp., 2014). Wybór leku przeciwbólowego zależy zatem od schorzenia, bezpieczeństwa i skuteczności leku a także nawyków i wiedzy klinicysty, łatwości w podawaniu leku przez właściciela i nie mniej istotnego, aspektu ekonomicznego.

U zwierząt towarzyszących, niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) i leki opioidowe są najczęściej stosowanymi środkami w leczeniu bólu. Obie jednak grupy obarczone są działaniami niepożądanymi, chociażby inhibitory cyklooksygenazy (COX) zwłaszcza w długoterminowym stosowaniu. Poszukiwanie zatem nowych szlaków terapeutycznych wykluczających np. inhibicję COX bądź łączących kilka różnych mechanizmów przeciwbólowych, może stanowić okazję dla rozwoju atypowych środków przeciwbólowych, które bądź zahamują powstawanie prozapalnych i pronocetywnych prostanoidów i kinin czy też zablokują receptory odpowiedzialne za transmisję bólu (m.in.: opioidowe μ i δ , α_2 -adrenergiczne, GABA B, serotoninowe 5-HT₃ i 5-HT₂, NMDA, AMPA, receptory NK-1 dla substancji P czy inne niepoznane) a zarazem nie będą obarczone szeregiem działań niepożądanych.

Badania farmakokinetyczne są jednym z pierwszych kroków w przedklinicznej ocenie leku. Poprzez badanie przebiegu zmian stężenia (ilości) leku i jego metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i wydalinach z równoczesnym ustaleniem zależności matematycznych opisujących i tłumaczących znalezione dane analityczne, możemy dokładnie poznać losy danej substancji w ustroju oraz wyznaczyć dla niej parametry farmakokinetyczne (Danysz i Kleinrok, 1996; Grabowski, 2015; Roliński, 2008). Ocena profilu farmakokinetycznego:

- umożliwia uzyskanie danych odnośnie zachowania leku *in vitro* a *in vivo*, np. mniej silne działające w warunkach *in vitro* cząsteczki leku, w warunkach *in vivo* z powodu ich korzystnej kinetyki (większa absorpcja, lepsza dystrybucja itp.), mogą być bardziej skuteczne;
- umożliwia ocenić wysokość stężeń leku w osoczu po podaniu różnymi drogami w stosunku do zastosowanej dawki w aspekcie ekstrapolacji danych np. z medycyny ludzkiej;
- umożliwia oszacować pole powierzchni pod krzywą i stężenie maksymalne leku stwierdzone w osoczu, dzięki którym można ocenić ekspozycję organizmu na lek;
- wykazuje różnice w farmakokinetyce między różnymi grupami pacjentów, różnymi gatunkami, różnymi drogami podania czy też długością leczenia i innymi czynnikami (np. podanie przed i po karmieniu);
- umożliwia ocenić zmienność między poszczególnymi osobnikami i zidentyfikować przypadki z odbiegającymi poziomami leku.

W konsekwencji znajomość kinetyki i efektów (farmakodynamika) działania leków jest niezbędna do prawidłowego zastosowania leku w terapii (Herman, 2001) poprzez ustalenie hipotetycznej dawki i interwałów podawania w oparciu o wartość MEC (Minimal Inhibitory Concentration - minimalne skuteczne stężenie), oszacowane nie tylko dla danego gatunku zwierzęcia, ale też ekstrapolowane z innych gatunków.

Moje badania skupiły się na ocenie z punktu widzenia farmakokinetyki, trzech związków o działaniu przeciwbólowym, które w swoim mechanizmie działania wychodzą poza inhibicję COX, włączając dodatkowe mechanizmy działania przeciwbólowego.

Badaniom poddano nowy w medycynie weterynaryjnej lek przeciwbólowy, grapiprant; od lat stosowany, ale z ograniczoną ilością dostępnych danych farmakokinetycznych odnośnie zwierząt towarzyszących, metamizol oraz ibudilast, którego działanie przeciwbólowe stanowi atrybut dodatkowy w stosunku do przewodniego działania przeciwastmatycznego, rozszerzającego naczynia i neuroprotekcijnego.

Podsumowując, cele badawcze w poszczególnych pracach obejmowały:

1. ocenę wpływu pokarmu na farmakokinetykę grapiprantu po podaniu doustnym (PO) u zdrowych psów (4.2.1);
2. określenie profilu farmakokinetycznego grapiprantu, po podaniu PO i dożylnym (IV) u zdrowych kotów (4.2.2);
3. określenie profilu farmakokinetycznego dwóch głównych aktywnych metabolitów metamizolu, po podaniu trzema różnymi drogami: IV, PO i domięśniową (IM) u zdrowych kotów (4.2.3);
4. określenie profilu farmakokinetycznego głównych aktywnych metabolitów metamizolu po podaniu IV, IM, PO i doodbytniczym (RC) u zdrowych psów (4.2.4);
5. ocenę wpływu pokarmu na farmakokinetykę ibudilastu po podaniu PO u zdrowych psów (4.2.5).

4.2.1. Profil farmakokinetyczny oraz oszacowanie biodostępności grapiprantu, nowego selektywnego antagonisty receptora prostaglandyny E₂, po podaniu doustnym u psów przegłodzonych i nakarmionych.

W ciągu ostatnich lat zachęcającymi wynikami we wstępnych badaniach weterynaryjnych charakteryzują się główne dwie klasy aktywnych składników przeciwbólowych, są to: rozpuszczalne inhibitory epoksydowe (Lee i wsp., 2015) i pipyrantry, nowa klasa farmaceutyków, które są antagonistami receptora prostaglandynowego.

Prostaglandyna E₂ jest kluczowym mediatorem zapalenia i bólu. Wywiera swoje działanie poprzez cztery receptory; EP₁, EP₂, EP₃ i EP₄ (Woodward i wsp., 2011). Receptor EP₄ jest pierwotnym mediatorem uwrażliwienia neuronów czuciowych i stanu zapalnego wywołanego przez prostaglandynę E₂. Receptor ten nie jest jednak jedynym, zaangażowanym w rozwój stanu zapalnego czy bólu, ale może pośredniczyć w uwrażliwieniu ośrodkowym i odgrywa rolę w powstawaniu chronicznego bólu zarówno u ludzi jak i zwierząt (Lin i wsp., 2006).

Grapiprant został odkryty w 2007 roku i zidentyfikowany jako konkurencyjny antagonistą prostanoidowego receptora EP₄, o podobnej sile działania u ludzi, szczurów (Nakao i wsp. 2007), a ostatnio u psów (Nagahisa i Okumura 2017). Grapiprant jest wysoce selektywny wobec ludzkiego receptora EP₄ w porównaniu z innymi receptorami prostanoidowymi (tj. EP₁, EP₂, EP₃, receptorami prostaglandyny D, F i I oraz receptorem tromboksanu A). Ostatnie badania wykazały, że grapiprant powoduje niewielkie działania niepożądane podczas przewlekłego stosowania u psów, ale w dawkach do 25 razy większych niż sugerowana dawka kliniczna (Rausch-Derra i wsp. 2015). Randomizowane, wieloośrodkowe badanie kliniczne wykazało, że grapiprant jest skuteczny w łagodzeniu bólu u psów z chorobą zwyrodnieniową stawów, i został oceniony jako lepiej tolerowany lek przeciwbólowy niż obecnie szeroko stosowane inhibitory COX (Rausch-

Derra i wsp. 2016a). Jego farmakokinetyka została zbadana u tego gatunku po doustnym podaniu tabletek oraz zawiesiny doustnej, odpowiednio, w dawkach 6 oraz 50 mg/kg (Rausch-Derra i wsp. 2016b).

Powszechnie wiadomo, że stały pokarm obecny w żołądku zmniejsza jego proces opróżniania, a jednocześnie zwiększa motorykę przewodu pokarmowego, nasilając pasaż poprzez jelita. Opóźnione przybycie leku do jelita cienkiego, gdzie następuje wchłanianie większości leków, może spowodować opóźnienie wchłaniania, a w konsekwencji niepełne wchłonięcie podanej dawki. Z drugiej strony, zwiększona ruchliwość jelit może zwiększyć szybkość przechodzenia leków przez jelita i niecałkowitą jego absorpcję (Welling, 1977). Należy podkreślić, że rodzaj żywności może mieć także wpływ na wchłanianie lipofilnych leków zależnych od przepływu żółci. Żółć działa jako środek powierzchniowo czynny w procesie rozpuszczania leku lipofilnego i poprawia przyswajalność tłuszczu, zwiększając absorpcję również leku. Ponadto, wydzielanie żółci może być zwiększone przez dietę o wysokiej zawartości tłuszczu (Dongowski i wsp., 2005).

Mając na uwadze brak zaleceń ze strony producenta odnośnie wpływu karmienia na skuteczność grapiprantu a także preferowanym przez właścicieli pacjentów weterynaryjnych, podawaniem większości leków z pokarmem, celem badania była ocena wpływu pokarmu na farmakokinetykę grapiprantu po podaniu doustnym w zalecanej przez producenta dawce 2 mg/kg i oszacowanie jego biodostępności.

Do badania włączono osiem zdrowych samic psów rasy Labrador, w wieku 4-10 lat, i wadze 34,5-42,1 kg. Badanie przeprowadzono w dwóch fazach. W pierwszej fazie (badanie pilotowe), dwa losowo wybrane zwierzęta otrzymały grapiprant dożylnie w dawce 0,5 mg/kg. W drugiej fazie zwierzęta przydzielono losowo do dwóch grup (metoda otwartej próby, z jednorazowym podaniem, badanie dwuetapowe, randomizowane i naprzemienne - *cross over*, *3x3 Latin Square*). Zastosowana doustna dawka odzwierciedla dawkę kliniczną zaproponowaną przez Rausch-Derra i in. (2015). Zwierzęta w pierwszej grupie ($n = 3$) otrzymywały jednorazowo doustnie (kapsułka żelatynowa) dawkę 2 mg/kg grapiprantu o godzinie 09:00 po 12 godzinach, nocnego głodzenia. Zwierzęta w grupie drugiej ($n = 3$) otrzymywały doustnie tę samą dawkę, ale były karmione jedną godzinę przed podaniem leku, o 08:00, komercyjną karmą dla psów. Pomiędzy kolejnymi etapami badania zastosowano tygodniowy okres karencji, po czym zwierzęta zamieniono i powtórzono doświadczenie. Próbkę krwi pobierano w standardowych interwałach czasowych wykorzystywanych do badań farmakokinetycznych (5, 15, 30 i 45 min oraz 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 i 36 h po podaniu grapiprantu). Próbkę osocza do analizy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) detekcją fluorescencyjną przygotowano zgodnie ze zwalidowaną metodą do oznaczania grapiprantu w osoczu psów przez De Vito i wsp. (2015). Krzywe stężeń grapiprantu w czasie u psów opisano modelem niekompartmentowym z wykorzystaniem oprogramowania WinNonlin (wersja 5.3.1, Pharsight Corp., St. Louis, MO, USA). Do porównania wartości między grupami zwierząt przegłodzonych i nakarmionych wykorzystano test t-Studenta. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których wartości $p < 0,05$.

W przeprowadzonym doświadczeniu żadne ze zwierząt nie wykazywało zaburzeń zachowania ani zdrowia zarówno podczas, jak i w ciągu 7 dni od zakończenia badania.

Po podaniu IV, stężenie grapiprantu było wykrywalne w osoczu do 24 h. Krzywe stężeń w osoczu względem czasu u obu psów były prawie identyczne i porównywalne ze stwierdzanymi u trzech psów rasy Beagle we wcześniejszym doświadczeniu (Nagahisa i Okumura 2017). Obliczone współczynniki ekstrakcji u obu psów wyniosły odpowiednio 7,7 i 8,6%, co sugeruje, że

wątroba i nerki psów (główne narządy oczyszczające) wykazują ograniczoną zdolność usuwania grapiprantu, choć dane te nie są wystarczające (uzyskane na podstawie 2 osobników) i wymagane są dalsze badania farmakokinetyczno-farmakodynamiczne, aby wyjaśnić tę kwestię.

Po podaniu doustnym grapiprantu psom na czczo stwierdzono dużą zmienność w stężeniach osoczowych ($p < 0,05$). Generalnie, absorpcja leku była szybka, a średnia okresu półtrwania w fazie eliminacji $t_{1/2\alpha}$ była podobna do tego stwierdzanego po podaniu IV. Oszacowana biodostępność F (obliczona z podania IV) u zwierząt na czczo wynosiła 111,9%.

Po doustnym podaniu grapiprantu zwierzętom nakarmionym stwierdzono opóźnione wchłanianie, choć występowały statystycznie istotne różnice między poszczególnymi osobnikami ($p < 0,05$). Średnie stężenie maksymalne C_{max} było niższe, a średni czas, w którym wystąpiło stężenie maksymalne T_{max} było opóźnione w porównaniu do psów na czczo ($p < 0,05$). Okres półtrwania w fazie eliminacji był podobny do obserwowanego u psów przegłodzonych i w grupie IV. Oszacowana biodostępność bezwzględna (obliczona z podania IV) u zwierząt nakarmionych wynosiła 66,19%. Względna biodostępność u zwierząt nakarmionych wynosiła 59,1 (51,5-63,3)%.

Podsumowując, po podaniu PO na czczo i po nakarmieniu, T_{max} oraz wartości okresu półtrwania w fazie eliminacji były zgodne z tymi, które odnotowano wcześniej (Rausch-Derra i wsp. 2016b), natomiast parametry takie jak AUC (pole powierzchni pod krzywą stężenia w funkcji czasu) i C_{max} (znormalizowane dla dawki) były niższe. Różnice te mogą wynikać z zastosowania różnych formułacji (tabletki i zawiesiny w porównaniu do kapsułek) a także innych interwałów pobierania prób w porównywanych doświadczeniach. Ponadto we wcześniejszym badaniu, liczba tabletek lub objętość zawiesiny podawanej wszystkim psom była taka sama niezależnie od masy ciała, co może również tłumaczyć różnice w wartościach AUC i C_{max} . Co więcej, w publikacji Rausch-Derra i wsp. 2016b, które pojawiło się po zakończeniu obecnego badania, doniesiono, że AUC, a w konsekwencji względna biodostępność, dla grapiprantu po podaniu doustnym była większa niż proporcjonalna do dawki. Podobnie kolejne, inne badanie na psach przedstawiło zwiększenie bezwzględnej biodostępności po podaniu doustnym grapiprantu w dawkach 1, 3 i 10 mg/kg (odpowiednio, 62, 90 i 110%). Wartości te obliczono przy użyciu wartości AUC dla psów, które otrzymały 1 mg/kg grapiprantu dożylnie (Nagahisa i Okumura 2017). Przyczyną braku liniowości w wartościach klirensu (Cl) i objętości dystrybucji mogą być prawdopodobnie także różne zastosowane dawki. Jeśli tą hipotezę zastosujemy do obecnego badania, w którym zastosowano różne dawki IV i doustną (odpowiednio 0,5 i 2 mg/kg), należałoby wartość biodostępności ponownie przeliczyć.

Sugerowana dawka grapiprantu do podawania wielokrotnego u psów na podstawie badań Rausch-Derra i wsp. 2015, wynosi 2 mg/kg, co 24 h u psów. Z uwagi na okres półtrwania grapiprantu, który wynosi około 6 h, a po podaniu, co 24 h, współczynnik akumulacji ($AUC_{w\ stan\ie\ stacjonarnym}/AUC_{po\ pierwsz\ej\ dawce}$) wynosi 1,07 należy się spodziewać, że obliczone stężenia w stanie stacjonarnym będą o 7% wyższe niż stężenia występujące w osoczu po podaniu pierwszej dawki (Toutain i Bousquet-Mélou 2004 a i b). Dlatego w takim schemacie dawkowania zjawisko kumulacji jest mało prawdopodobne. Ponadto, gdy zastosuje się ten sam odstęp między dawkami (24h), stosunek stężenia maksymalnego do minimalnego w stanie stacjonarnym wyniesie 16 (Toutain i Bousquet-Mélou 2004 a i b).

Stężenie grapiprantu w osoczu osiągające działanie przeciwbólowe u psów zostało teoretycznie oszacowane na 164 ng/ml na podstawie hamowania ostrego bólu u szczurów a także badań u ludzi z chorobą zwyrodnieniową stawów (114 ng/ml) (Nagahisa i Okumura 2017). Jeśli

przyjmie się, że wartość 164 ng/ml jest minimalnym skutecznym stężeniem (MEC) u psów, to grapiprant podawany w dawce 2 mg/kg, zarówno u zwierząt przegłodzonych jak i nakarmionych będzie przekraczał MEC do 6 h od podania leku. Należy podkreślić, że mogą występować pewne rozbieżności między stężeniem w osoczu a faktycznym efektem przeciwbólowym na poziomie receptora (Toutain i Lees, 2004). W szczególności, w przypadkach klinicznych spotyka się większą histerezę farmakokinetyczno-farmakodynamiczną, niż u zdrowych pacjentów. Wtedy parametry, takie jak czas początkowy osiągnięcia i czas występowania stężeń powyżej MEC należy zweryfikować za pomocą klinicznych badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

Obniżona względna biodostępność po podaniu doustnym (59,1%) u psów nakarmionych, w porównaniu ze zwierzętami przegłodzonymi (111,9%) może być problemem w przypadku leków, które muszą być podawane raz dziennie przez dłuższy okres, tak jak ma to miejsce w przypadku grapiprantu. Trudno jest bowiem, uzyskać warunki postu w celu optymalizacji absorpcji grapiprantu, jeśli psy są karmione częściej niż raz dziennie. Jednak spadek stężenia grapiprantu w osoczu wywołany nakarmieniem, stwierdzony w niniejszym badaniu, dotyczy głównie C_{max} , i ma znikomy wpływ na długość czasu utrzymywania się stężenia leku powyżej MEC.

Podsumowując, jest to pierwsze badanie dotyczące farmakokinetyki nowego antagonisty receptora prostaglandynowego EP₄ zastosowanego w dawce klinicznej u psów. Wyniki wykazały znaczną różnicę w biodostępności między zwierzętami przegłodzonymi i nakarmionymi. Co wskazuje, że wypełnienie przewodu pokarmowego może mieć istotny wpływ na farmakokinetykę, ale niewielki wpływ na czas występowania stężeń grapiprantu w osoczu przekraczających teoretyczną MEC dla tego gatunku. Konieczne są dalsze badania w celu rzetelnej oceny biodostępności w przypadku dawki klinicznej a także oceny liniowości klirensu i objętość dystrybucji.

Wyniki przeprowadzonego badania opublikowano w pierwszej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Lebkowska-Wieruszewska B., Barsotti G., Lisowski A., Gazzano A., Owen H., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetics and estimated bioavailability of grapiprant, a novel selective prostaglandin E₂ receptor antagonist, after oral administration in fasted and fed dogs. *New Zealand Veterinary Journal* 65:19-23.

4.2.2. Farmakokinetyka grapiprantu, selektywnego antagonisty receptora EP₄, prostaglandyny PGE₂, po doustnym i dożylnym podaniu w dawce 2 mg/kg u kotów.

Ze względu na spokojny charakter i subtelną ekspresję bólu, koty są stosunkowo rzadko leczone przeciwbólowo w porównaniu do innych gatunków zwierząt (Carroll i Simonson, 2005). Na rynku istnieje ograniczona liczba zatwierdzonych leków przeciwbólowych dla kotów, a użycie leków niezarejestrowanych dla tego gatunku, może być niebezpieczne ze względu na duże różnice gatunkowe w farmakokinetyce i farmakodynamice większości leków (Lascelles i wsp., 1999, 2007; Toutain, 2010). Chociaż dostępność leków jest znikoma, potrzeba uśmierzania bólu u kotów wzrasta, szczególnie w okresie pooperacyjnym, gdyż często wykonywane zabiegi stomatologiczne, onychektomia (usuwanie pazurów) i zabiegi ortopedyczne są wysoce bolesne, zwłaszcza w czasie rekonwalescencji (Hellyer i wsp., 2007; Lorena i wsp., 2014). Z tych powodów, badanie nowych

substancji aktywnych odpowiednich do skutecznej przeciwbólowej terapii kotów staje się priorytetem.

Grapiprant jest identyfikowany, jako konkurencyjny antagonist receptorów prostanoidowych EP₄ o podobnej sile działania u ludzi, szczurów (Nakao i wsp., 2007) oraz u psów (Nagahisa i Okumura, 2017). Randomizowane badanie kliniczne wykazało, że grapiprant jest skuteczny w łagodzeniu bólu u psów z chorobą zwyrodnieniową stawów (Giorgi, 2015a, Rausch-Derra, 2016a) a ostatnie badania wykazały jego skuteczność przeciwbólową (porównywalną do meloksykamu)

w karagenowym modelu zapalenia u królików (De Vito i wsp., 2017). Z uwagi na skąpe dane literaturowe oraz wcześniejsze wyniki własne badań profilu farmakokinetycznego u psów, postanowiłam kontynuować te badania na kotach.

Wcześniejsze badanie na kotach (Rausch-Derra i Rhodes, 2016) przedstawiło znikome informacje odnośnie toksykokinetyki, parametrów farmakokinetycznych oraz krzywych profilu stężenia w funkcji czasu, dlatego też, badanie zaprojektowano tak, by ocenić całkowitą farmakokinetykę grapiprantu, w dawce 2 mg/kg po podaniu doustnym i dożylnym u kotów.

Badanie przeprowadzono na 6 kastrowanych, klinicznie zdrowych, dorosłych kotach rasy europejskiej, o masie ciała w przedziale 3,0-3,8 kg. Zwierzęta zostały przydzielone losowo do dwóch grup doświadczalnych (badanie prowadzone metodą otwartej próby, z jednorazowym podaniem, dwuetapowe, randomizowane, naprzemienne – *cross over, 3x3 Latin Square*). Każde zwierzę w grupie I (n=3) otrzymało pojedynczą dawkę 2 mg/kg grapiprantu (1 kapsułka żelatynowa/zwierzę), o godzinie 9:00 rano po 10 godzinnym nocnym przegłodzeniu. Doustna dawka odzwierciedlała dawkę kliniczną dla psów (Rausch-Derra, 2015). Każde zwierzę grupy II (n=3) otrzymywało tę samą dawkę jak grupa I ale przez iniekcje dożylną (IV). Pomiędzy kolejnymi etapami badania zastosowano tygodniowy okres karencji, a następnie grupy zamieniono i powtórzono badanie. Próbkę krwi pobierano w standardowych interwałach czasowych wykorzystywanych do badań farmakokinetycznych (5, 15, 30 i 45 min oraz 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 24 i 36 h po podaniu grapiprantu). Próbkę osocza do analizy HPLC z detekcją fluorescencyjną przygotowano zgodnie z metodą do oznaczania grapiprantu w osoczu psów przedstawioną przez De Vito i wsp. (2015b) a następnie zwalidowaną pod kątem analizy osocza kotów. Krzywe stężenia grapiprantu w czasie u psów opisano modelem niekompartmentowym z wykorzystaniem oprogramowania WinNonlin (wersja 5.3.1, Pharsight Corp., St. Louis, MO, USA).

W przeprowadzonym doświadczeniu żadne ze zwierząt nie wykazało zaburzeń zachowania ani zdrowia zarówno podczas jak i w ciągu 3 dni od zakończenia badania.

Po podaniu IV stężenia grapiprantu były wykrywalne w osoczu do 24 h, u pięciu z sześciu zwierząt. Średnia AUC_{last}, czyli do ostatniego zmierzonego punktu czasowego, wynosiła 12,295 h•ng/ml a klirens 173,2 ml/h/kg. Objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym V_{ss} obliczono na 918,5 ml/kg, podczas gdy T_{1/2λz} = 5,48 h. Obliczony współczynnik ekstrakcji mieścił się w zakresie 3,7%-1,5%, co sugeruje, że udział wątroby i nerek (główne organy oczyszczające) w wydalaniu grapiprantu u tego gatunku jest bardzo ograniczony.

Stwierdzono dużą zmienność w wartościach stężeń grapiprantu w osoczu po podaniu doustnym. Lek ten był wykrywalny, ale w znikomych ilościach, choć w tym samym przedziale czasowym (0,083-24 h), co po podaniu dożylnym. Wchłanianie leku zachodziło szybko (średnia wartość T_{max} = 1,33; w zakresie 1-2 h). Średnia wartości T_{1/2λz} (4,40 h) była podobna do uzyskanej po podaniu IV a razem z T_{max} były też zgodne z wcześniej opisywanymi u kotów (Rausch-Derra

i Rhodes, 2016). Biodostępność po podaniu doustnym wynosiła 39,6%. C_{max} w zakresie 490-750 ng/ml (średnia, 625 ng/ml), jeśli uwzględnimy znormalizowanie do dawki, była również zgodna z maksymalnym stężeniem stwierdzanym w wcześniejszym badaniu Rausch-Derra i Rhodes (2016), natomiast wartość AUC była prawie trzykrotnie wyższa. Ta różnica jest trudna do wytłumaczenia, ponieważ w badaniu Rausch-Derra i Rhodes's (2016) analizowanych było tylko kilka parametrów toksykokinetycznych oraz brak jest danych odnośnie profilu krzywej stężeń grapiprantu do czasu. Taką rozbieżność mogły wygenerować m.in. różnice w badanych populacjach kotów, różne czasy pobierania prób a także różnice we wrażliwości samej metody analitycznej. Kolejnym czynnikiem, który mógł zmodyfikować wchłanianie grapiprantu, był stan wypełnienia przewodu pokarmowego. W przeprowadzonym doświadczeniu zwierzęta były poddane głodzeniu przez noc a pokarm podano 4 h po podaniu badanego leku, podczas gdy w doświadczeniu Rausch-Derra i Rhodes (2016), pokarm przywrócono już po 30-45 min od podania leku. Warto podkreślić, że wcześniejsze badanie u psów wykazało wyraźną różnicę między biodostępnością grapiprantu u psów przegłodzonych i nakarmionych (Łebkowska-Wieruszewska i wsp., 2017).

W leczeniu psów, grapiprant zalecany jest w dawce 2 mg/kg, do podawania wielokrotnego co 24 h (Rausch-Derra i wsp., 2015). Natomiast lek ten nie jest zarejestrowany dla kotów. Biorąc pod uwagę, okres półtrwania grapiprantu u kotów, który wynosi około 4-5 h, a podanie w odstępie 24 h daje współczynnik kumulacji blisko 1, to teoretycznie obliczone stężenia w stanie stacjonarnym, będą podobne do uzyskanych stężeń w osoczu stwierdzanych już po pierwszej dawce grapiprantu (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b). W związku z tym mało prawdopodobne jest, aby doszło do problemu akumulacji przy takim sposobie dawkowania. Ponadto, stosując ten sam interwał podawania (24 h), stosunek stężenia maksymalnego do minimalnego w stanie stacjonarnym obliczono na 64 (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b), co wskazuje na dużą zmienność przy takim dawkowaniu.

Osoczowy poziom stężenia grapiprantu wymagany do opanowania bólu u psów został teoretycznie oszacowany w zakresie 114-164 ng/ml (Nagahisa i Okumura, 2017). Stąd, jeśli wyższe stężenie (164 ng/ml) przyjmie się, jako minimalne skuteczne stężenie przeciwbólowe grapiprantu dla kotów, to na podstawie niniejszego profilu farmakokinetycznego, podanie grapiprantu PO w dawce 2 mg/kg, będzie osiągać stężenia przekraczające MEC do 10 h. Ta hipoteza pozwala na teoretyczne obliczenie dawki skutecznej (IV i PO) u kotów. Odnosząc się do wzoru obliczeniowego (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004a):

$$\text{Częstotliwość dawkowania} = Cl \cdot \text{stężenie terapeutyczne} / \text{biodostępność},$$

obliczona dawka IV powinna wynosić 0,68 mg/kg/dzień. Natomiast, zgodnie z powyższą regułą, ze względu na niską biodostępność po podaniu doustnym (39%), dawka grapiprantu tą drogą powinna wynosić 1,74 mg/kg/dzień, co jest jednocześnie bardzo zbliżone do klinicznej dawki zalecanej dla psów. Dodatkowo dzięki dobremu profilowi bezpieczeństwa grapiprantu (Rausch-Derra i Rhodes, 2016), wysoki współczynnik stosunku stężenia maksymalnego do minimalnego w osoczu nie powinien stanowić problemu i pojedyncza dawka dzienna może być bezpiecznie stosowana, zamiast rozdziału na dwa podania, co 12 h (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b). Należy jednak pamiętać, że może występować pewna rozbieżność między osiąganym stężeniem w osoczu i rzeczywistym efektem przeciwbólowym na poziomie receptora (Toutain i Lees, 2004) a niniejsze badania są wyłącznie statystyczną hipotezą skuteczności w oparciu

o profil farmakokinetyczny. Przykładowo, ostatnio opublikowane badanie wykazało wydłużone działanie przeciwbólowe grapiprantu u królików, sugerujące wytwarzanie aktywnego metabolitu lub powolną dysocjację leku z receptorem (De Vito i wsp., 2017).

Podsumowując, uśredniony profil farmakokinetyczny grapiprantu był podobny do wcześniej opisanego u psów (Łebkowska-Wieruszewska i wsp., 2017). Stwierdzono niską biodostępność grapiprantu po podaniu doustnym u kotów, pomimo że osoczowe stężenia leku przekraczały ekstrapolowany z psów MEC przez 10 h. Sugerowana zmniejszona zdolność wątroby i nerek kotów do usuwania grapiprantu, jest zgodna z wcześniejszym przeze mnie przeprowadzonym badaniem na psach, gdzie współczynnik ekstrakcji wynosił 7-8% (Łebkowska-Wieruszewska i wsp., 2017).

Wyniki przeprowadzonego badania opublikowano w drugiej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Łebkowska-Wieruszewska B., De Vito V., Owen H., Poapolathep A., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetics of grapiprant a selective EP₄ prostaglandin PGE₂ receptor antagonist after 2 mg/kg oral and IV administrations in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:11-15.

4.2.3. Profile farmakokinetyczne dwóch głównych aktywnych metabolitów metamizolu, po podaniu trzema różnymi drogami u kotów.

Zachęcona wynikami profilu farmakokinetycznego grapiprantu u kotów, postanowiłam zbadać kolejny związek o silnym działaniu przeciwbólowym, który jest zatwierdzony do stosowania u psów i innych gatunków zwierząt a brak jest danych farmakokinetycznych odnośnie kotów.

Metamizol (MET), znany również jako dipyrone, jest nieopiodowym lekiem przeciwbólowym. Chociaż, dokładny mechanizm działania nadal nie jest w pełni wyjaśniony; jego efekt może wynikać z tłumienia syntezy prostaglandyn poprzez hamowanie izoenzymu cyklooksygenazy 3 (tzw. ośrodkowa postać COX), jak również od aktywacji układów opioidowych czy kanabinoidowych (Jasiecka i wsp., 2014). MET jest prolekiem, który po podaniu ulega hydrolizie. Stężenie leku macierzystego gwałtownie spada poniżej poziomu wykrywalności we krwi w ciągu kilku minut po podaniu dożylnym (Levy i wsp., 1995; Vlahov i wsp., 1990). U ludzi MET jest szybko metabolizowany do czterech głównych metabolitów. Wśród nich jest: 4-metyloaminoantipiryna (MAA) i 4-aminoantipiryna (AA), które zostały uznane za posiadające działanie przeciwgorączkowe, przeciwzapalne i właściwości przeciwbólowe. Biologicznie nieistotne są natomiast pozostałe dwa metabolity MET, tj.: 4-formyloaminoantipiryna (FAA) i 4-acetyloaminoantipiryna (AAA) (EMA, 2003). Jednocześnie, MET jest nieodpowiednim markerem pozostałości, gdyż jest szybko metabolizowany nieenzymatycznie do MAA u ludzi i u większości gatunków zwierząt, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* a zarazem niewykrywalny po podaniu doustnym (Levy i in., 1995 r., EMA, 2003).

MET ma stosunkowo wysoki profil bezpieczeństwa zważywszy na neurologiczne działania niepożądane, w porównaniu do innych NLPZ stosowanych u ludzi. Co więcej, MET jest stosowany jako jedna z silniejszych opcji łagodzenia bólu u pacjentów z nowotworami (Gaertner i wsp., 2017; Hedenmalm i Spigset, 2002; Kötter i wsp., 2015). W weterynarii MET jest stosowany głównie drogami iniekcyjnymi: IV lub IM jako środek przeciwzapalny u koni, bydła, świń a także służy do łagodzenia bólu pooperacyjnego u psów (Imagawa i wsp., 2011). Nie zgłaszano żadnych istotnych

działań niepożądanych mimo szerokiego zastosowania tego leku u różnych gatunków zwierząt przez wiele lat (EMA, 2003). W związku z brakiem danych na temat farmakokinetyki MET u kotów i duże zapotrzebowanie rynku na bezpieczne i łatwe w podawaniu leki przeciwbólowe dla tego gatunku, za cel badania przyjęto określenie profilu farmakokinetycznego dwóch głównych aktywnych metabolitów, MAA i AA, po podaniu MET trzema różnymi drogami: IV, IM i PO.

Sześć klinicznie zdrowych, dorosłych kotów, mieszańców (zakres wagi 3,2-5,2 kg) losowo przydzielono do trzech grup doświadczalnych w układzie badania naprzemiennego (*cross-over*). Zwierzęta zostały przegłodzone 12 h, przed podaniem leku. MET w dawce 25 mg/kg podano trzema drogami: IV, IM i PO. Dawka zastosowana jest zalecaną dawką kliniczną dla psów. Pomiedzy poszczególnymi etapami zastosowano 2-tygodniowy okres karencji, po którym każdorazowo grupy zamieniono i powtórzono badanie. W konsekwencji każda grupa zwierząt otrzymała MET trzema różnymi drogami. Próbkę krwi pobierano w standardowych dla badań farmakokinetycznych interwałach czasowych (5; 15; 30; 45 min oraz 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 24; 34 i 48 h po podaniu MET).

Analiza HPLC z detekcją UV została przeprowadzona zgodnie wcześniej opisaną metodyką, którą poddano niewielkim modyfikacjom (Domínguez-Ramírez i wsp., 2012; Giorgi i wsp., 2015) i walidacji pod kątem analizy osocza kotów.

Parametry farmakokinetyczne dla dwóch głównych aktywnych metabolitów MET zostały określone z wykorzystaniem modelu niekompartimentowego (WinNonlin wersja 5.3.1, Pharsight Corp., St. Louis, MO, USA). Parametry farmakokinetyczne zostały poddane badaniu pod kątem normalności testem Shapiro-Wilka. Aby ocenić różnice statystyczne między poszczególnymi drogami podania, przeprowadzono test Wilcoxa dla par obserwacji. Za statystycznie istotne zostały uznane różnice, gdy wartości $p < 0,05$.

Działania niepożądane stwierdzono we wszystkich grupach (drogach podania). Ślinienie i wymioty odnotowano po podaniu IV oraz IM u odpowiednio 4 i 2 zwierząt, podczas gdy tylko jeden kot wykazywał ślinienie po podaniu MET drogą PO. Wszystkie te objawy ustępowały samoistnie w ciągu kolejnych 4 h, od podania leku.

W niniejszym badaniu zarówno stężenie MAA jak i AA w osoczu stwierdzono w przypadku wszystkich dróg podania do 24 h, po podaniu leku.

Średnie stężenie MAA w osoczu było znacząco wyższe po podaniu IV w pierwszych punktach czasowych pobierania próbek krwi (do 1 h po podaniu leku) w porównaniu do drogi PO oraz IM, które stopniowo zmniejszały się do podobnego poziomu stwierdzanego po podaniu PO oraz IM w 24 h. Choć C_{max} po podaniu PO oraz IM nie różniły się istotnie, T_{max} był opóźniony w przypadku drogi PO w porównaniu z pozostałymi drogami podania. Podanie IV tj., bezpośrednie wprowadzenie związku macierzystego - MET do krążenia ogólnego mogło bowiem spowodować szybkie utworzenie metabolitu MAA w porównaniu z pozostałymi drogami podania, w których wymagana jest faza absorpcji. Podobnie zaobserwowano, że wartości C_{max} i T_{max} metabolitu MAA są różne po podaniu IV oraz IM u owiec, koni i osłów (Aupanun i wsp., 2016; Giorgi i wsp., 2017).

W przeciwieństwie do niniejszego badania wartości AUC były porównywalne po podaniu IV i IM u koni i owiec, co wskazuje na podobną ekspozycję na lek w organizmie w przypadku obu dróg iniekcyjnych, gdzie zaobserwowano wysoki współczynnik (stosunek podania pozanaczyniowego do dożylnego) $AUC_{EV/IV}$ (odpowiednio 1,06 i 1,12 dla koni i owiec) (Giorgi i wsp., 2017). Co więcej, w przypadku osłów, AUC było nawet wyższe po podaniu IM w porównaniu z podaniem IV (Aupanun i wsp., 2016). Obecne badanie wykazało, że koty mają

stosunkowo niską wartość $AUC_{EV/IV}$ w porównaniu z wcześniej wspomnianymi gatunkami zwierząt, co wskazuje na względnie mniejsze wchłanianie leku do krążenia ogólnego po podaniu IM (zakładając, że MET został całkowicie przekształcony do MAA zarówno po podaniu IM jak i IV). Różnicę tę można tłumaczyć miejscem podania tj. w niniejszym badaniu MET podano IM poprzez iniekcję w mięsień pośladka w przeciwieństwie do badania u koni, owiec i osłów, gdzie lek został wstrzyknięty do mięśni szyi (Aupanun i in., 2016; Giorgi i wsp., 2017). Stopień bowiem wchłaniania ogólnoustrojowego leków podawanych domięśniowo jest zwykle wyższy, gdy miejscem iniekcji jest boczna część szyi w porównaniu do podania w mięsień pośladkowy, gdyż ten region ma większą powierzchnię chłonną związaną z wyższym przepływem krwi do tkanek (Baggot, 1998). Co więcej, chociaż brak jest danych na temat różnic we wchłanianiu zależnym od miejsca podania związanym z hydrolizą MET, to w poprzednim badaniu brano pod uwagę wpływ czynników fizykochemicznych, takich jak pH, temperatura i stężenie leku a szybkość hydrolizy MET (Ergün i wsp., 2004).

Wiadomo, że po podaniu doustnym, MET jest hydrolizowany w przewodzie pokarmowym i szybko wchłania się z T_{max} równym 1-2 h (Levy i wsp., 1995). W niniejszym badaniu T_{max} wyniósł około 6 h dla MAA po podaniu PO i wartość ta była najwolniejszą w porównaniu do innych dróg podania (0,083 i 1,16 h odpowiednio dla podania IV i IM). Ponadto, stwierdzono prawie całkowite wchłanianie leku po podaniu PO, co również potwierdził wysoki stosunek $AUC_{EV/IV}$, który był wyższy niż dla podania IM (0,63) i porównywalny ze stwierdzanym u ludzi (0,81) (Nikolova i wsp., 2012).

Stała szybkości eliminacji (λ_z) MAA była podobna w przypadku wszystkich dróg podania, podczas gdy okres półtrwania w fazie eliminacji wynosił około 6-7 h, czyli znacząco dłużej niż stwierdzany u owiec, koni i osłów (ok 1-3 h) (Aupanun i wsp., 2016 r., Giorgi i wsp., 2017). Może to sugerować względnie powolną eliminację samego MAA lub konwersję MAA do AA u kotów. U ludzi ponad 90% podawanego MET jest wydalane w postaci metabolitów drogą nerkową, a tylko 10% jest wydalane w postaci MAA (Nikolova et al., 2012). Jeśli eliminacja u kotów jest taka sama jak u ludzi, bądź przynajmniej częściowo podobna, to za stwierdzaną stosunkowo powolną eliminację może być odpowiedzialne powolne przekształcanie MAA w AA, co wiąże się również z wyższym średnim stężeniem AA, jeśli porównamy te wartości opisane u koni i osłów (Aupanun i wsp., 2016; Giorgi et al., 2017).

W porównaniu do MAA, metabolit AA wykazał niższe średnie stężenia w osoczu we wszystkich badanych grupach. W związku z tym wartości parametrów farmakokinetycznych, takich jak C_{max} , T_{max} i AUC, były również mniejsze. Powstawanie metabolitu AA było znacznie szybsze po podaniu IV niż po podaniu PO i IM. Metabolit AA wykazał dłuższy $t_{1/2\lambda_z}$ niż MAA w przypadku wszystkich dróg podania. Podanie IM wykazało najkrótszy półokres eliminacji wśród wszystkich dróg podania. Ponadto, zaobserwowano znacznie dłuższy okres półtrwania w fazie eliminacji w przypadku wszystkich dróg podania w porównaniu do wcześniej opisywanych u ludzi (4-5,5 h), koni (4,2-6,4 h) i osłów (2,6-3,8 h) natomiast z wyższymi wartościami C_{max} i AUC (Aupanun i wsp., 2016; Giorgi i wsp., 2017; Vlahov i wsp., 1990). Wiadomo, że metabolit AA przekształca się do AAA z udziałem polimorficznego enzymu N-acetylotransferazy (NAT2) (Geisslinger i wsp., 1996). NAT jest ważnym enzymem, uczestniczącym w szeregu reakcji metabolicznych aryloaminy. W badaniu Trepanier i wsp. (1998) zaobserwowano, że koty mają mniejszą ilość systemów enzymatycznych NAT2 w porównaniu do innych gatunków zwierząt, co może mieć wpływ na niższą acetylację niektórych leków przez wątrobę kota. Niedobór szlaku

NAT2 u kotów może, więc opóźnić konwersję AA do AAA i powodować wzrost stężenia AA w osoczu.

Za większość efektów analgetycznych MET u ludzi odpowiedzialne są metabolity MAA i AA, choć w różny sposób. Zaobserwowano, że MAA charakteryzuje krótszy czas wystąpienia zauważalnego działania, podczas gdy AA ma dłuższy okres półtrwania w fazie eliminacji (Nikolova i wsp., 2012). Średnia dawka skuteczna ED₅₀ działania przeciwbólowego dla MAA i AA wynosi odpowiednio 99 i 104 mg/kg, choć AA wykazywało jeszcze niższe wartości ED₅₀ niż MAA w teście aktywności przeciwzapalnej (EMA, 2003). Ponadto, MAA hamuje cyklooksygenazę o 50 razy silniej niż MET, a AA ma mniejszą aktywność w tym zakresie niż MAA (Nikolova i wsp., 2012). Chociaż dokładny udział metabolitów w działaniu przeciwbólowym u kotów jest nadal niepoznany, można się spodziewać, że wyższa osoczowa średnia stężeń AA może powodować wydłużenie działania przeciwbólowego w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt.

Warto podkreślić, że droga PO wykazała wyższy stosunek AUC_{EV/IV} w porównaniu do podania IM zarówno dla metabolitu AA, jak i MAA, co wskazuje na lepsze wchłanianie. Co więcej, pomimo że przy wszystkich drogach podania stwierdzono przemijające działania niepożądane jak ślinienie i wymioty, podanie PO charakteryzowało się najniższą częstością występowania tych objawów (tylko jeden kot) w porównaniu do pozostałych dróg podania (IV: 4, IM: 2). W przeciwieństwie do drogi IV i IM, droga doustna ma tę zaletę, że pozwala właścicielowi samemu aplikować lek swojemu pupilowi w domu, bez potrzeby interwencji lekarza (zastrzyki). Podanie PO może, zatem być wygodniejszą drogą aplikacji, w porównaniu do drogi IM.

Wyniki przeprowadzonego badania opublikowano w trzeciej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Lebkowska-Wieruszewska B., Kim TW., Chea B., Owen H., Poapolathep A., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetic profiles of the two major active metabolites of metamizole (dipyrone) in cats following three different routes of administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41:334–339.

4.2.4. Profile farmakokinetyczne aktywnych metabolitów metamizolu, po podaniu czterema różnymi drogami u psów.

Praca ta stanowi kontynuację badań nad farmakokinetyką metamizolu (MET). Lek ten jest szeroko stosowany w weterynaryjnej praktyce klinicznej, choć dane odnośnie profilu farmakokinetyczno-farmakodynamicznego MET lub jego aktywnych metabolitów u zwierząt są ograniczone lub jest ich brak. W przypadku psów, tylko dwa badania opisują podstawowe parametry farmakokinetyczne MAA i AA po podaniu doustnym pojedynczej dawki 50 mg MET/kg (Kalchofner Guerrero i wsp., 2015; Loescher et al., 1993).

Biorąc powyższe pod uwagę, badanie zostało zaprojektowane w celu porównania profilu farmakokinetycznego MAA i AA po podaniu MET różnymi drogami: dożylnie (IV), domięśniowo (IM), doustnie (PO) i doodbytniczo (RC), u zdrowych psów. Badanie przeprowadzono na sześciu zdrowych, dorosłych, samicach psów, rasy Labrador, w wieku 3- 6 lat i wadze 36-42 kg. Psy losowo przydzielono do czterech grup badawczych, stosując metodę otwartej próby, z jednorazowym podaniem i podaniem czterema drogami (badanie czterofazowe, niesparowane, naprzemienne *cross over* (4×4 *Latin square*)). Zwierzęta zostały poddane głodówce na 10 h przed

rozpoczęciem doświadczenia. Pokarm był dostępny od 4 h po podaniu leku. Ponadto, zwierzęta poddano obserwacji klinicznej w trakcie i przez tydzień po zakończeniu badania.

W pierwszej fazie każdemu ze zwierząt w grupie 1 (n=2) podawano pojedynczą dawkę 25 mg/kg MET dożylnie. Grupa 2 (n=1) otrzymała wstrzyknięcie domięśniowe w tej samej dawce, co grupa 1, w środkową ćwiartkę mięśnia pośladkowego. Grupa 3 (n=2) otrzymała tę samą dawkę doustnie, w postaci tabletki szybko-uwalniającej (preparat dla ludzi). Grupa 4 (n=1) otrzymała MET w w/w dawce w postaci czopka doodbytniczego, RC. Dawki zostały przygotowane poprzez wcześniejszy podział i odważenie leku w zależności od wagi każdego psa. Dawka została ustalona na podstawie wskazań dostępnych na ulotce weterynaryjnego preparatu iniekcyjnego oraz danych z wcześniejszego badania wykazującego skuteczność dawki 25 mg/kg u psów (Imagawa i wsp., 2011). Okres karencji pomiędzy czterema fazami (aby zapewnić całkowitą eliminację MAA i AA) wynosił 1 tydzień. Następnie grupy zostały zamienione, aż do zakończenia badania w układzie naprzemiennym. Próbkę krwi pobierano w interwałach czasowych zwykle stosowanych w badaniach farmakokinetycznych (5, 15, 30 i 45 min oraz 1; 1,5; 5; 4; 6; 8; 10; 24; 36 i 48 h od podania leku). Oznaczenie metabolitów MET przeprowadzono techniką HPLC z detekcją UV wykorzystując metodę analityczną zmodyfikowaną w oparciu o wcześniej opisane metody (Domínguez-Ramírez i wsp., 2012; Giorgi i wsp., 2015b) oraz rewalidowaną, dla osocza psa. Obliczenia farmakokinetyczne przeprowadzono w oparciu o analizę niekompartmentową (WinNolin ver. 5.3.1., Pharsight Corp.). Aby dokonać porównań między poszczególnymi drogami podania leku, najpierw przetestowano różne parametry pod kątem rozkładu normalnego i jednorodności wariancji. Dane badano wykorzystując test ANOVA lub test nieparametryczny Wilcoxon w zależności od tego, czy dane przeszły test normalności. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których wartości $p < 0,05$.

Nie zaobserwowano działań niepożądanych u zwierząt po podaniu IV, IM oraz RC w trakcie i przez 14 dni po zakończeniu doświadczenia. U trzech psów po podaniu doustnym stwierdzono samoustępujące (po 15-30 min) zwiększone ślinienie.

Stężenia MAA i AA w osoczu po podaniu MET wszystkimi badanymi drogami były wykrywalne do 24 h u wszystkich zwierząt, z wyjątkiem fazy początkowej gdzie, stężenia w funkcji czasu dla podania IV oraz IM były podobne.

Najwyższe stężenia MAA stwierdzono odpowiednio po podaniu IV > IM > PO > RC. Stwierdzone istotne różnice w wartościach C_{max} przypisano różnym drogom podania MET. Stężenia MAA były wyższe niż AA po podaniu IV oraz IM. Całkowite i nagłe wprowadzenie MET do kompartmentu naczyniowego (wstrzyknięcie dożylnie) mogło w początkowych minutach spowodować szybszy metabolizm leku (MET do MAA), zwiększając C_{max} metabolitu MAA, w porównaniu do podania IM, w którym na tym etapie spodziewana jest faza absorpcji. Tworzenie MAA zależy bowiem od nieenzymatycznej, zależnej od pH hydrolizy MET i jest natychmiastowe, gdy tylko MET dociera do krążenia ogólnego (Ergun i wsp., 2004). pH krwi może przyspieszać tworzenie MAA, gdyż im niższy pH, tym szybciej zachodzi hydroliza (Ergun i wsp., 2004). Należy jednak podkreślić, że nie stwierdzono u badanych zwierząt żadnych działań niepożądanych po podaniu IV pomimo natychmiastowego osiągnięcia wysokiego stężenia MAA w krążeniu ogólnym. Natomiast stężenie AA przekraczało najwyższą wartość MAA w 6 h po podaniu MET drogą PO i RC. Warto zauważyć, że średnie stężenie AA po podaniu PO było wyższe (podwójnie) niż po podaniu innymi drogami.

Różnice w wartościach T_{max} mogą być również związane z fazą absorpcji. Na podstawie względnych wartości AUC_{0-last} (pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas od zera do ostatniego zmierzonego stężenia), obliczono: $AUC_{IM\ MAA}/AUC_{IV\ MAA}$, $AUC_{PO\ MAA}/AUC_{IV\ MAA}$ i $AUC_{RC\ MAA}/AUC_{IV\ MAA}$, które wynosiły odpowiednio $0,75\pm 0,11$; $0,59\pm 0,08$ i $0,32\pm 0,05$. Wartości AUC_{MAA} (IV vs. IM) wykazały, że po podaniu leku drogą IM, ekspozycja na aktywny metabolit w stosunku do czasu jest statystycznie inna, ale nadal wysoka (75%).

$T_{1/2\lambda z}$ osiągnięty dla MAA był podobny do opisanego wcześniej u psów (4-5 h) i koni (4,85 h), wyższy niż u owiec (1,45-3 h) i osłów (1,81 h) oraz niższy niż u prosiąt (8,57 h) (Aupanun i wsp., 2016; Burmańczuk i wsp., 2016; Klaus i wsp., 1997). Przyczyny tych rozbieżności mogą być spowodowane różnymi czynnikami, jak: odmienne drogi podania, gatunki zwierząt, wiek i warunki patofizjologiczne zwierząt czy też wrażliwość metody analitycznej.

Zakładając, że po podaniu IV cały lek jest przekształcany do MAA, parametry takie jak: stosunek V_d/F i stosunek Cl/F można uznać za wartości bezwzględne. Współczynnik V_d/F był duży, i zgodny ze stwierdzanym w płynie mózgowo-rdzeniowym a Cl/F określa współczynnik ekstrakcji, który osiągnął 6-9% (Cohen i wsp., 1998). To odkrycie sugeruje, że udział wątroby i nerek (główne narządy oczyszczania) u psów w wydalaniu MAA jest ograniczony. Nawiązuje to też do niewielkiej ilości wyprodukowanego metabolitu AA.

Wartość C_{max} metabolitu MAA po podaniu leku PO, jeśli ujednicimy dawki, była porównywalna z tą przedstawioną w poprzednim badaniu u psów (Kalchofner Guerrero i wsp., 2015). Jednak, pomimo że, w badaniu Kalchofnera-Guerrero (2015) nie przedstawiono parametrów farmakokinetycznych, faza eliminacji MAA wydaje się wolniejsza niż w niniejszym badaniu. Prawdopodobnie wynika to z zastosowania różnych formułacji zawierających MET: preparat natychmiastowego uwolnienia (moje badanie) vs. preparat wolno uwalniający (Kalchofner Guerrero i wsp., 2015).

Profil farmakokinetyczny MAA po podaniu doodbytniczym leku odzwierciedla profil uzyskany po podaniu PO, ale w niższych stężeniach. Podanie RC dało zarówno najniższe C_{max} metabolitu MAA (2,72 $\mu\text{g/ml}$) jak i najniższy współczynnik $AUC_{RC/IV}$ (32,78%) wśród badanych dróg podania. Prawdopodobną przyczyną niskiego stężenia MAA po podaniu RC jest sekwestracja leku w kale, czyli główna wada podania doodbytniczego. Zjawisko to może tłumaczyć także niski współczynnik AUC uzyskany tą drogą podania. Poprzednie badania z zastosowaniem czopków doodbytniczych przeznaczonych dla ludzi również wykazały zmniejszoną biodostępność u psów (De Vito i wsp., 2015a, Giorgi i wsp., 2009). Ponieważ podanie doodbytnicze wykazało skrócenie czasu występowania uzyskanych stężeń powyżej wartości MEC należy przyjąć, że ta droga podania jest najmniej skuteczną u psa.

Profile farmakokinetyczne uzyskane dla metabolitu AA po podaniu leku droga IV, IM oraz RC były podobne. Na podstawie względnych wartości AUC_{0-last} , obliczono: $AUC_{IM\ AA}/AUC_{IV\ AA}$, $AUC_{PO\ AA}/AUC_{IV\ AA}$ i $AUC_{RC\ AA}/AUC_{IV\ AA}$, które wynosiły odpowiednio $1,21\pm 0,33$; $2,17\pm 0,62$ i $1,08\pm 0,19$. Jedynie po podaniu leku PO, stężenia w osoczu, oraz AUC_{0-last} podwajają wartości uzyskane po podaniu pozostałymi drogami. Zjawisko to jest niejasne, ale podobną różnicę w stężeniach AA w osoczu zaobserwowano u koni po podaniu IM i IV (Giorgi i wsp., 2017) i prawdopodobnie może być wynikiem metabolizmu pierwszego przejścia MAA do AA w przypadku drogi doustnej.

U ludzi, działanie przeciwbólne MET koreluje ze stężeniem dwóch aktywnych metabolitów: MAA i AA w osoczu, które różnią się w odniesieniu do czasu ich wystąpienia ($MAA < AA$)

i okresu półtrwania w fazie eliminacji (MAA i AA, odpowiednio 4-5 i 5-8 h) (Nikolova i wsp., 2012). Wykazano, że oba metabolity hamują ludzki COX-1 i COX-2 przy odpowiednio średnim stężeniu hamującym IC_{50} równym 2,55 μ M i 4,65 μ M oraz 8,2- do 9-krotnie wyższych wartościach IC_{50} dla AA (Hinz i wsp., 2007). Ponadto, MAA jest około 50 razy bardziej aktywny niż MET jako inhibitor enzymu COX-3, podczas gdy AA jest mniej aktywny niż MET (Nikolova i wsp., 2012). Jest to ważna informacja, dla podkreślenia, że metabolity, które generują efekt przeciwbólowy u psów są nadal nieznane. Jeśli przyjmuje się, że u psów działanie przeciwbólowe związane jest jedynie z metabolitami MAA i AA, tak jak ma to miejsce u ludzi, to wpływ metabolitu AA na ogólny terapeutyczny efekt przeciwbólowy można uznać za nieistotny ze względu na jego słabą aktywność i niskie stężenia w osoczu (poniżej IC_{50} dla COX-1/2) we wszystkich badanych w tym doświadczeniu drogach podania. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że metabolit MAA wydaje się być jedynym związkiem generującym efekt terapeutyczny u psów. Jednak niezbędne są dodatkowe badania, aby ocenić, czy przyjęty wzór metaboliczny znany z badań u ludzi można przełożyć na psy.

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia opublikowano w czwartej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Giorgi M., Lebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Owen H., Poapolathep A., Kim T.W., De Vito V. (2018) Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites after four different routes of administration in healthy dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 41:428-436.

Wyniki, zostały również zaprezentowane na międzynarodowej konferencji w postaci doniesienia posterowego:

- Giorgi M., Lebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Owen H., Poapolathep A., De Vito V., Sitovs A. Biopharmaceutics of Metamizole in Healthy Dogs. *RSU ZINĀTNISKĀ KONFERENCE, 6–7 kwietnia 2017, Ryga, Łotwa*, str.238.

4.2.5. Profil farmakokinetyczny ibudilastu, inhibitora fosfodiesterazy, po doustnym podaniu 5 mg/kg psom przegłodzonym i nakarmionym. Badanie wstępne.

Poszukując nowych środków o działaniu przeciwbólowym natrafiłam na Ibudilast, którego charakterystyka farmakologiczna wydała mi się wyjątkowo ciekawa.

AV-411, ibudilast, jest nieselektywnym inhibitorem cyklicznej fosfodiesterazy nukleotydowej (PDE). Hamuje głównie fosfodiesterazę PDE_3A , PDE_4 , PDE_{10} i PDE_{11} z połową maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) w zakresie około 1-10 μ M. Ibudilast hamuje także inne rodzaje PDE, ale w mniejszym stopniu (Gibson i wsp. 2006). Stąd, klinicznie stosuje się go w leczeniu astmy, zaburzeniach naczyniowo-mózgowych (Rolan i wsp. 2009) i alergiach ocznych (Yokogaki i wsp. 2002). Ibudilast hamuje także produkcję wielu mediatorów zapalnych, takich jak $TNF-\alpha$, interleukiny (1- β i 6) oraz tlenu azotu, ponadto hamuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu w sposób zależny od stężenia (Kawanokuchi et al. 2004, Mizuno i in. 2004). Wiadomo, że wszystkie te mediatory działają na neurony nocyceptywne w celu indukcji, utrzymania i nasilenia bólu (Watkins i Maier 2003). Nic więc dziwnego, że ibudilast ma działanie przeciwbólowe, które przejawia się przy dawkach 5-10 razy wyższych niż tych stosowanych w leczeniu astmy zaobserwowanych w doświadczeniach na szczurzych modelach bólu

neuropatycznego (Ledeboer i wsp. 2007). Stwierdzono również, że ibudilast nasila działanie przeciwbólowe morfiny, zmniejszając ryzyko wystąpienia tolerancji (Hutchinson i wsp. 2009).

Mechanizm działania ibudilastu w łagodzeniu bólu nadal nie jest jasny. Spekuluje się, że hamowanie PDE może nie odgrywać głównej roli, natomiast istotny będzie wpływ na regulację funkcji komórek glejowych (Rolan i wsp. 2009).

W literaturze weterynaryjnej dostępne są dane odnośnie farmakokinetyki ibudilastu u zwierząt laboratoryjnych oraz psów. Jednakże, farmakokinetyka ibudilastu u różnych gatunków zwierząt wykazuje znaczną wewnątrz- i międzygatunkową zmienność (Sanftner i wsp. 2009). Zważywszy, że obecność pokarmu w przewodzie pokarmowym może znacząco wpływać na losy leku w organizmie (Welling 1997; Dongowski et al. 2005), celem badania była ocena profilu farmakokinetycznego ibudilastu w dawce 5 mg/kg po podaniu doustnym u psów przegłodzonych i nakarmionych.

Do doświadczenia włączono sześć zdrowych, dorosłych, psów, rasy Labrador (1 samiec i 5 samic), w wieku od 3 do 6 lat i masie ciała w zakresie 34-40 kg. Psy zostały losowo przydzielane do dwóch grup doświadczalnych, gdzie zastosowano model badania otwarty, jednodawkowy, jednorazowego podania, dwufazowy, naprzemienny - *cross over* (2×2 *Latin-square*). Zwierzęta poddano obserwacji klinicznej w trakcie i przez 2 tygodnie po zakończeniu badania. Psy w grupie 1 ($n=3$) zostały przegłodzone nocą, przez co najmniej 10 h przed rozpoczęciem doświadczenia i nakarmione 4 h po podaniu leku, podczas gdy psy w grupie 2 ($n=3$) otrzymywały karmę komercyjną *ad libitum*. W pierwszym etapie badania każdy pies w grupie 1 i 2 otrzymał pojedynczą dawkę ibudilastu w ilości 5 mg/kg podaną doustnie. Działanie łagodzące ból wywoływane przez ibudilast występuje w dawce 5-10 razy większej od dawki klinicznej normalnie stosowanej (10-30 mg/człowieka) (Ledeboer i in. 2007). W oparciu o średnią masę ciała człowieka 60-70 kg, znormalizowaną dawkę, która będzie przynosiła ulgę w bólu, zastosowaną do badania dawkę oszacowano na 5 mg/kg. Dawki przygotowano przez ręczne ważenie i rozdzielenie leku (10 mg/kapsułka) adekwatnie do wagi poszczególnych zwierząt. Pomiędzy kolejnymi etapami zastosowano jednotygodniowy okres karencji, po czym grupy zamieniono a badanie powtórzono.

Próbki krwi pobierano w interwałach czasowych charakterystycznych dla badań farmakokinetycznych (5, 15, 30, 45 min oraz 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 i 48 h po podaniu ibudilastu).

Do oznaczenia ibudilastu w próbkach osocza wykorzystano technikę HPLC–DAD. Metoda analityczna z niewielkimi modyfikacjami została opracowana w oparciu o wcześniejsze badania (Yoon i wsp. 2010, Cho i in. 2013) a także zwalidowana pod kątem analizy osocza psów. Analizę farmakokinetyczną ibudilastu przeprowadzono wykorzystując model niekompartmentowy (WinNonlin wersja 5.3.2, Pharsight Corp., St. Louis, MO, USA). Zmienność farmakokinetyczna została oceniona przy użyciu testu t-Studenta. Określono statystycznie istotne różnice między grupami terapeutycznymi. Zarówno parametry farmakokinetyczne jak i stężenia ibudilastu w osoczu testowano pod kątem normalności rozkładu testem Shapiro-Wilka. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których $p < 0,05$.

Nie zaobserwowano żadnych zaburzeń zachowania ani zdrowia u zwierząt podczas, jak też przez 2 tygodnie po badaniu.

Ibudilast był wykrywalny w osoczu psów do 24 h po podaniu leku. Stwierdzono dużą zmienność pomiędzy zwierzętami zarówno w grupie psów nakarmionych jak i przegłodzonych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami.

Maksymalne stężenia leku (C_{\max} 6,27 i 5,24 $\mu\text{g/ml}$ po podaniu psom odpowiednio, nakarmionym i przegłodzonym) stwierdzone w tym badaniu, po znormalizowaniu do zastosowanej dawki, były zgodne z opisanymi we wcześniejszym badaniu (Fanbo i wsp. 2000), gdzie podawano psom ibudilast doustnie w dawce 10 mg/kg (C_{\max} 9,68 $\mu\text{g/ml}$). Oraz sprzeczne z wynikami u psów rasy Beagle, którym podawano ibudilast doustnie w dawce 1 mg/kg (Sanftner i wsp. 2009), gdzie wykazano niższą wartość C_{\max} (0,7 $\mu\text{g/ml}$). Wartości AUC (52,906 $\text{h}\cdot\mu\text{g/ml}$ i 31,909 $\text{h}\cdot\mu\text{g/ml}$ odpowiednio u psów przegłodzonych i nakarmionych) były porównywalne z tymi stwierdzonymi wcześniej u psów (Fanbo i wsp. 2000), ale znacznie wyższe niż obserwowane u szczurów, królików, osłów i świnek miniaturowych w dawce 1 mg/kg (w zakresie od 0,0003 do 0,0869 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$).

Wartości $t_{1/2\alpha}$, nie różniły się znacząco pomiędzy grupami badanymi jak i w porównaniu z przedstawionymi we wcześniejszych badaniach na psach (Fanbo i wsp. 2000). Jeśli jednak wartości z niniejszego badania porównamy z wartościami uzyskanymi w poprzednich badaniach na szczurach, królikach, osłach i świnkach miniaturowych, stwierdza się dla tego parametru znaczną zmienność międzygatunkową (Sanftner i wsp. 2009); zakres 0,69-12,27 h. Różnice obserwowane w parametrach farmakokinetycznych ibudilastu u różnych gatunków zwierząt mogą być częściowo tłumaczone zastosowaniem różnych postaci leków, dróg podania (Sanftner i wsp. 2009), metabolizmem leku (Martignoni i wsp. 2006) oraz rasą (Labradory vs. Beagle) (Toutain i Ferran 2010). Konieczne są więc dalsze badania, aby je wyjaśnić.

Podsumowując, w niniejszym badaniu zmienność była większa niż oczekiwano, stąd siła badania do wykrycia różnic między grupami zmalała. Za dodatkowe wyjaśnienie znacznej zmienności można uznać użycie dużej liczby tabletek podawanych każdemu psu, a co za tym idzie dużej ilości podanego leku (dawka 5-10 razy większej od dawki klinicznej normalnie stosowanej), która mogła spowodować zróżnicowanie wchłaniania ibudilastu u poszczególnych psów (Letendre i wsp. 2016). Biorąc pod uwagę wyniki tego wstępnego badania, choć nieistotne statystycznie, uzasadniają podjęcie dalszych badań nad wpływem podania pokarmu na farmakokinetykę ibudilastu na większej populacji zwierząt.

Wyniki przeprowadzonego badań opublikowano w piątej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Lebkowska-Wieruszewska B., De Vito V., Kowalski C.J., Owen H., Poapolathep A., Lisowski A., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetic profiles of 5 mg/kg ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor, orally administered to dogs in fasted and non-fasted states. A preliminary study. *Polish Journal of Veterinary Studies* 21:281-285.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań

Przedstawione powyżej badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków dotyczących kinetyki badanych leków przeciwbólowych:

- Wypełnienie przewodu pokarmowego może mieć istotny wpływ na farmakokinetykę grapiprantu u psów, choć niewielki wpływ na czas występowania stężeń grapiprantu w osoczu przekraczających teoretyczną wartość MEC.
- Profil farmakokinetyczny grapiprantu u kotów jest podobny do przedstawionego u psów.

- Niskie wartości obliczonych współczynników ekstrakcji grapiprantu zarówno u psów jak i kotów sugerują, że wątroba i nerki u tych gatunków mają ograniczoną zdolność usuwania grapiprantu.
- Proponowana kliniczna dawka grapiprantu (2 mg/kg) dla psów, zastosowana u kotów w terapii powtarzanej co 24 h, wydaje się być skuteczna, bezpieczna i zbliżona, do obliczonej w oparciu o analizę profilu farmakokinetycznego dawki dla kotów, pomimo uzyskania niskiej wartości biodostępności u tego gatunku.
- U kotów metamizol przekształca się w aktywne metabolity, podobnie jak u innych gatunków zwierząt i ludzi; jednak okresy półtrwania zarówno metabolitu MAA, jak i AA są dłuższe, co może zapewnić dłuższą skuteczność przeciwbólową u tego gatunku zwierząt.
- Wyższy stosunek wartości $AUC_{EV/IV}$ po podaniu metamizolu PO niż IM, przy minimalnych samo ustępujących działaniach niepożądanych (IV>IM>PO) sugeruje, że droga doustna jest najlepszą do podawania u kotów.
- Profile farmakokinetyczne metabolitu metamizolu, MAA u psów były różne dla każdej drogi podania, podczas gdy profile farmakokinetyczne metabolitu AA były podobne dla podania drogą IV, IM i RC.
- Metabolit MAA wydaje się być jedynym związkiem generującym efekt terapeutyczny u psów ze względu na niskie stężenia w osoczu uzyskiwane przez metabolit AA.
- Skrócenie czasu uzyskanych stężeń MAA powyżej wartości MEC po podaniu RC, sugeruje, że ta droga wydaje się najmniej skuteczną u psów.
- Pomimo, że w badaniu pilotowym, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w profilu farmakokinetycznym ibudilastu u psów przegłodzonych i nakarmionych, ocena danych sugeruje, że stan wypełnienia przewodu pokarmowego może mieć wpływ na wartość AUC, co uzasadnia przeprowadzenie w przyszłości podobnych badań na większej populacji zwierząt.

4.2.6. Piśmiennictwo

- 1) Aupanun S., Laus, F., Poapolathep A., Owen H., Vullo C., Faillace V., Giorgi M. (2016) Pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-Methyl-amino-antipyrine and 4-Acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (Dipyrone) in Healthy Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science* 47:55–61.
- 2) Baggot J. D. (1998) Antimicrobial selection, administration and dosage: Continuing education. *Journal of the South African Veterinary Association* 69:174–185.
- 3) Burmańczuk A., Kowalski C., Giorgi M., Owen H., Grabowski T. (2016) Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolites 4-methylamino-antipyrine and 4-amino-antipyrine after intramuscular injection of metamizole in healthy piglets. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 39:616–620.
- 4) Carroll G. L., Simonson S. M. (2015) Recent developments in nonsteroidal antiinflammatory drugs in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 41:347–354.
- 5) Cho H.Y., Parkb G.K., Leeb Y.B. (2013) Simultaneous determination of morniflumate and its major active metabolite, niflumic acid, in human plasma by high-performance liquid chromatography in stability and pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography* 27:1438-1443.
- 6) Cohen O., Zylber-Katz E., Caraco Y., Granit L., Levy M. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyrone metabolites after a single oral dose of dipyrone. *European Journal of Clinical Pharmacology* 54:549–553.

- 7) Danysz A., Kleinrok Z. (1996) Podstawy Farmakologii dla lekarzy, farmaceutów i studentów medycyny. Wydawnictwo VOLUMED, Wrocław.
- 8) De Vito V., Lebkowska-Wieruszewska B., Owen H., Kowalski C.J., Giorgi M. (2014) Pharmacokinetic profiles of the analgesic drug flupirtine in cats. *Veterinary Journal* 202:309-313.
- 9) De Vito V., Lebkowska-Wieruszewska B., Shaban A., Kowalski C.J., Lisowski A., Giorgi M. (2015) Pharmacokinetic profiles of the analgesic drug flupirtine in dogs after the administration of four pharmaceutical formulations. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42:629-637.
- 10) De Vito V., Saba A., Lee H.K., Owen H., Poapolathep A., Giorgi M. (2015) Detection and quantification of the selective EP4 receptor antagonist CJ-023423 (grapiprant) in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 118:251–258.
- 11) De Vito V., Salvadori M., Poapolathep A., Owen H., Rychshanova R., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of grapiprant in a carrageenan-induced inflammatory pain model in the rabbit. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:468-475.
- 12) Domínguez-Ramírez A. M., Calzadilla P. C., Cortés-Arroyo A. R., y de la Peña M. H., López J. R. M., Gómez-Hernández M., López-Muñoz F. J. (2012) High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71:173–178.
- 13) Dongowski G, Fritsch B, Giessler J, Hartl A, Kuhlmann O, Neubert RH (2005) The influence of bile salts and mixed micelles on the pharmacokinetics of quinine in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60:147-151.
- 14) EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)(2003) Committee for Veterinary Medicinal Products –Metamizole –Summary, Report (2), EMEA/MRL/878/03, London, UK.
- 15) Ergun H., Frattarelli D. A., Aranda J. V. (2004) Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyron. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35:479–487.
- 16) Fanbo Z., Xiaorui C., Mojiong Z. (2000) Pharmacokinetic studies of Ibudilast in dogs. *Acta Universitatis Medicinae Tongji* 29:207-208.
- 17) Gaertner J., Stamer U. M., Remi C., Voltz R., Bausewein C., Sabatowski R. i wsp. (2017) Metamizole/dipyron for the relief of cancer pain: A systematic review and evidence-based recommendations for clinical practice. *Palliative Medicine* 31:26–34.
- 18) Geisslinger G., Böcker R., Levy M. High-performance liquid chromatographic analysis of dipyron metabolites to study their formation in human liver microsomes. *Pharmaceutical Research* 13:1272–1275.
- 19) Gibson L.C., Hastings S.F., McPhee I., Clayton R.A., Darroch C.E., Mackenzie A., Mackenzie F.L., Nagasawa M., Stevens P.A., Mackenzie S.J. (2006) The inhibitory profile of ibudilast against the human phosphodiesterase enzyme family. *European Journal of Pharmacology* 538:39-42.
- 20) Giorgi M. (2015) CJ-023,423 (Grapiprant) a potential novel active compound with antihyperalgetic properties for veterinary patients. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 10:53–56.
- 21) Giorgi M., De Vito V., Lee H. K., Laus F., Kowalski C., Faillace V. i wsp. (2015) Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4- methylamino- antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. *Small Ruminant Research* 132:143–146.
- 22) Giorgi M., Del Carlo S., Lebkowska-Wieruszewska B., Kowalski C.J., Saccomanni G. (2010) Pharmacokinetics of tramadol and metabolites after injective administrations in dogs. *Polish Journal of Veterinary Science* 13:639-644.
- 23) Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G., Lebkowska-Wieruszewska B., Kowalski C. J. (2009) Pharmacokinetics of tramadol and its major metabolites following rectal and intravenous administration in dogs. *New Zealand Veterinary Journal* 57:146–152.

- 24) Giorgi, M., Aupanun, S., Lee, H. K., Poapolathep, A., Rychshanova, R., Vullo, C. i wsp.(2017). Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites in healthy horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:165–171.
- 25) Giorgi, M., Yun, H.I. (2012) Pharmacokinetics of mirtazapine and its main metabolites in Beagle dogs: A pilot study. *Veterinary Journal* 192:239-241.
- 26) Grabowski T. (2015) Farmakokinetyka i biofarmacja. www.biokinetica.pl
- 27) Hedenmalm K., Spigset O. (2002) Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). *European Journal of Clinical Pharmacology* 58:265–274.
- 28) Hellyer P., Rodan I., Brunt J., Downing R., Hagedorn J. E., Robertson S. A. (2007) AAHA/AAFP Pain Management Guidelines Task Force Members, AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 9:466–480.
- 29) Herman T.W. (2001) Farmakokinetyka. Teoria i Praktyka. *Wydawnictwo lekarskie PZWL*, Wydanie I, Warszawa.
- 30) Hinz B., Cheremina O., Bachmakov J., Renner B., Zolk O., Fromm M. F., Brune K. (2007) Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: New insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB Journal* 21:2343–2351.
- 31) Hutchinson M.R., Lewis S.S., Coats B.D., Skyba D.A., Crysedale N.Y., Berkelhammer D.L., Brzeski A., Northcutt A., Vietz C.M., Judd C.M., Maier S.F., Watkins L.R., Johnson K.W. (2009) Reduction of opioid withdrawal and potentiation of acute opioid analgesia by systemic AV411 (ibudilast). *Brain, Behavior and Immunity* 23:240-250
- 32) Imagawa V. H., Fantoni D. T., Tatarunas A. C., Mastrocinque S., Almeida T. F., Ferreira F., Posso I. P. (2011) The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 38:385–393.
- 33) Jasińska A., Maślanka T., Jaroszewski J. J. (2014) Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 17:207–214.
- 34) Kalchofner Guerrero K. S., Schwarz A., Wuhrmann R., Feldmann S., Hartnack S., Bettschart-Wolfensberger R. (2015) Comparison of a new metamizole formulation and carprofen for extended post-operative analgesia in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Veterinary Journal* 204:99–104.
- 35) Kawanokuchi J., Mizuno T., Kato H., Mitsuma N., Suzumura A. (2004) Effect of IFN- β on microglial functions as inflammatory and antigen cells in the central nervous system. *Neuropharmacology* 46:734-742.
- 36) Kim T.W., Lebkowska-Wieruszewska B., Owen H., Hyoin Yun, Kowalski C.J., Giorgi M. (2014) Pharmacokinetic profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. *Veterinary Journal*, 200:77-81.
- 37) Klaus A. M., Schlingloff Y., Kleinitz U., Böttcher M., Hapke H. J. (1997) Pharmacokinetic study of dipyron metabolite 4-MAA in the horse and possible implications for doping control. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20:204–208.
- 38) Kötter T., da Costa B. R., Fässler M., Blozik E., Linde K., Jüni, P. w wsp. (2015) Metamizole-associated adverse events: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 10, e0122918. doi: [10.1371/journal.pone.0122918](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122918)
- 39) Lascelles B. D. X., Capner C. A., Waterman-Pearson A. E. (1999) Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for cats and small mammals. *Veterinary Record* 145:601–604.
- 40) Lascelles B. D. X., Court M. H., Hardie E. M., Robertson S. A. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cats: A review. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 34:228–250.
- 41) Lebkowska-Wieruszewska B., Barsotti G., Lisowski A., Gazzano A., Owen H., Giorgi M. (2017) Pharmacokinetics and estimated bioavailability of grapiprant, a novel selective prostaglandin E2

- receptor antagonist, after oral administration in fasted and fed dogs. *New Zealand Veterinary Journal* 65:19-23.
- 42) Ledebøer A., Hutchinson M.R., Watkins L.R., Johnson K.W. (2009) Ibutilast (AV-411) a new class therapeutic candidate for neuropathic pain and opioid withdrawal syndromes. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16:935-950.
 - 43) Lee H.K., De Vito V., Giorgi M. (2015) Soluble epoxide hydrolase inhibitors: new molecules with potential for use in veterinary medicine. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 69:55–61.
 - 44) Lee H.K., Lebkowska-Wieruszewska B., Kim T.W., Kowalski C., Giorgi M. (2013) Pharmacokinetics of the novel atypical opioid tapentadol after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in cats. *Veterinary Journal* 198: 620-624.
 - 45) Letendre L., Harriman J., Drag M., Mullins A., Malinski T., Rehbein S. (2016) The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner and milbemycin oxime when used as a combination chewable parasiticide for dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:35-43.
 - 46) Levy M., Zylber-Katz E., Rosenkranz B. (1995) Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clinical Pharmacokinetics* 28:216–234.
 - 47) Lin C.R., Amaya F., Barrett L., Wang H., Takada J., Samad T.A., Woolf C.J. (2006) Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319:1096–1103.
 - 48) Loescher W. (1993) Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. w W. Liischer, F. R. Ungemach & R. Kroker (Eds.), *Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren* (105–106) Berlin und Hamburg, Germany: Verlag Paul Parey.
 - 49) Lorena S. E., Luna S. P., Lascelles B. D. X., Corrente J. E. (2014) Current attitudes regarding the use of perioperative analgesics in dogs and cats by Brazilian veterinarians. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 41:82–89.
 - 50) Martignoni M., Groothuis G.M., De Kanter R. (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2:875-94.
 - 51) Mizuno T., Kurotani T., Komatsu Y., Kawanokuchi J., Kato H., Mitsuma N., Suzumura A. (2004) Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibutilast on neuronal cell death induced by activated microglia. *Neuropharmacology* 46:404-11.
 - 52) Nagahisa A., Okumura T. (2017) Pharmacology of grapiprant, a novel EP4 antagonist: receptor binding, efficacy in a rodent post-operative pain model, and a dose estimation for controlling pain in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:285-292.
 - 53) Nakao K., Murase A., Ohshiro H., Okumura T., Taniguchi K., Murata Y., Masuda M., Kato T., Okumura Y., Takada J. (2007) CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322:686–94.
 - 54) Nikolova I., Tencheva J., Voinikov J., Petkova V., Benbasat N., Danchev N. (2012) Metamizole: A review profile of a well-known “forgotten” drug. Part I: Pharmaceutical and nonclinical profile. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26:3329–3337.
 - 55) Rausch-Derra L.C., Huebner M., Rhodes L. (2015) Evaluation of the safety of long-term, daily oral administration of grapiprant, a novel drug for treatment of osteoarthritic pain and inflammation, in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research* 76:853–859.
 - 56) Rausch-Derra L.C., Huebner M., Wofford J., Rhodes L. (2016a) A prospective, randomized, masked, placebo-controlled multisite clinical study of grapiprant, an EP4 prostaglandin receptor antagonist (PRA), in dogs with osteoarthritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30:756–763.

- 57) Rausch-Derra L.C., Rhodes L. (2016) Safety and toxicokinetic profiles associated with daily oral administration of grapiprant, a selective antagonist of the prostaglandin e2 ep4 receptor, to cats. *American Journal of Veterinary Research* 77:688–692.
- 58) Rausch-Derra L.C., Rhodes L., Freshwater L., Hawks R. (2016b) Pharmacokinetic comparison of oral tablet and suspension formulations of grapiprant, a novel therapeutic for the pain and inflammation of osteoarthritis in dogs. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 39:566-571.
- 59) Rolan P., Hutchinson M.R., Johnson K.W. (2009) Ibutilast: a review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10:2897-2904.
- 60) Roliński Z. (2008) Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna. *Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa.
- 61) Sanftner L.M., Gibbons J.A., Gross M.I., Suzuki B.M., Gaeta F.C.A., Johnson K.W. (2009) Cross-species comparisons of the pharmacokinetics of ibutilast. *Xenobiotica* 39:964-97.
- 62) Toutain P.L., Bousquet-Mélou A. (2004) Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27:427–439.
- 63) Toutain P.L., Ferran A., Bousquet-Mélou A. (2010) Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handbook of Experimental Pharmacology* 199:19-48.
- 64) Toutain P.L., Lees P. (2004a) Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27:467-477.
- 65) Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 415–425.
- 66) Trepanier L. A., Criblv A. E., Spielberg S. P., Rayh K. (1998) Deficiency of cytosolic arylamine JV-acetylation in the domestic cat and wild felids caused by the presence of a single JVATI-like gene. *Pharmacogenetics* 8:169–179.
- 67) Vlahov V., Badian M., Verho M., Bacracheva N. (1990) Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *European Journal of Clinical Pharmacology* 38:61–65.
- 68) Watkins L.R., Maier S.F. (2003) Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:973-85.
- 69) Welling PG (1977) Influence of food and diet on gastrointestinal drug absorption: a review. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 5:291-334.
- 70) Woodward D.F., Jones R.L., Narumiya S. (2011) International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacological Reviews* 63:471–538.
- 71) Yokogaki S., Suzuki Y., Ohashi M. (2002) Introduction of a new anti-allergic ophthalmic solution: ibutilast ophthalmic solution (Ketas Eye drops). *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 16:24-28.
- 72) Yoona H., Cho H.Y., Leeam Y.B. (2010) Determination of ibutilast in human serum by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 24:324-328.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Jestem autorem bądź współautorem łącznie 45 publikacji naukowych, w skład których wchodzi 22 oryginalnych prac naukowych oraz 51 doniesień zjazdowych prezentowanych w formie referatów i plakatów zarówno na krajowych jak i zagranicznych konferencjach naukowych. Spośród opublikowanych prac oryginalnych w 7 jestem pierwszym autorem.

Po wyłączeniu 5 prac oryginalnych stanowiących podstawę cyklu habilitacyjnego, na mój dorobek składa się:

- 15 prac oryginalnych w języku angielskim
- 1 praca przeglądowa w języku angielskim
- 2 prace oryginalne w języku polskim
- 2 prace przeglądowe w języku włoskim
- 13 prac przeglądowych w języku polskim
- 7 monografii – autorstwo rozdziałów
- 51 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakatowe)

w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

- 9 prac oryginalnych w języku angielskim
- 1 praca oryginalna w języku polskim
- 5 prac przeglądowych w języku polskim
- 3 monografie – autorstwo rozdziałów
- 37 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakatowe)

Łączny IF mojego dorobku naukowego wynosi **29,265**. Analogicznie liczona, zsumowana liczba punktów **MNiSW** wynosi **582**. Aktualny **indeks Hirscha (H)** liczony wg. Bazy *Web of Science* wynosi **7**.

Dotychczasowo moje publikacje były **cytowane 162** razy w krajowych i zagranicznych czasopiśmie z listy A JCR (na dzień 12 lipca 2018r. na podstawie raportu Biblioteki Głównej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie).

5.1. Wykaz i omówienie publikacji naukowych opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Farmakologii, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych tego samego Wydziału, pod opieką prof. dr hab. Cezarego Kowalskiego.

W okresie studiów doktoranckich skupiłam się na opanowaniu technik stosowanych w badaniach dotyczących farmakokinetyki, farmakodynamiki oraz określania pozostałości leków używanych w medycynie weterynaryjnej (antybiotyków i chemioterapeutyków). W tym czasie rozpoczęłam szczegółowe badania nad opracowaniem odpowiednio czulej metody analitycznej, umożliwiającej oznaczenie pozostałości sulfachloropirazyny (SCP) w tkankach jadalnych drobiu po podaniu doustnym a następnie zajęłam się przeanalizowaniem wpływu rozkładu pozostałości sulfachloropirazyny w tkankach kurcząt i indyków na okres karencji.

Badania przeprowadziłam na 34 kurczętach rzeźnych oraz na 33 indykach. SCP została podana kurczętom oraz indykom indywidualnie, *per os* (do wola), w jednakowej dawce 50 mg/kg przez 3 kolejne dni. Tkanki zostały pobrane w przypadku kurcząt po 5, 10, 14 i 16 dniach, natomiast u indyków po 7, 12, 18, 21 i 23 dniach od momentu zaprzestania podawania leku. Zawartość SCP została oznaczona, według modyfikacji własnej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV, poddanej walidacji dla badanych tkanek drobiu.

Wykazano przydatność opracowanej metody analitycznej do badań nad oznaczaniem pozostałości SCP w tkankach, jak również w badaniach innych chemioterapeutyków z grupy sulfonamidów w procesie wyznaczenia okresu karencji.

Pomimo, że najwyższe stężenia badanego leku stwierdziłam w mięśniach, rozkład pozostałości SCP w nerce oraz wątrobie wydaje się mieć również istotny wpływ na długość karencji w tkankach drobiu. Jednocześnie różnice zarówno w wartościach stężeń leku jak i szybkości spadku pomiędzy kolejnymi dniami, świadczą o dużym wpływie gatunku na rozkład pozostałości SCP w poszczególnych tkankach.

Wyniki przedstawiłam w pracy doktorskiej oraz 3 publikacjach naukowych w czasopiśmie z listy JCR:

- 5.1.1. Kowalski C., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Osypiuk M. (2009) High performance liquid chromatography determination of sulphachloropyrazine residues in broiler and turkey edible tissues. *Journal of Chromatography B* 877:1787-1791. (MNiSW2009 = 24; IF2009 = 2,777)
- 5.1.2. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. (2010) Sulfachloropyrazine residues depletion in turkey edible tissues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33:389–395. (MNiSW2010 = 32; IF2010 = 1,675)
- 5.1.3. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. (2013) The residue depletion of sulfachloropyrazine in edible tissues of broiler chickens. *Food Additives and Contaminants Part A* 30:272-277. (MNiSW2013 = 30; IF2013 = 2,341)

Wyniki zostały również zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci wykładów i doniesień posterowych:

- **Lebkowska-Wieruszewska B.** Różnice w oznaczonych technika HPLC wartościach stężeń sulfachloropirazyliny w tkankach kurcząt i indyków w aspekcie wyznaczania okresu karencji, VI Konferencja naukowa doktorantów „Problemy technologii produkcji roślinnej, zwierzęcej i żywności”, 06-07.03.2008 Lublin, str.60-61.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Osypisk M., Polska B. Monitorowanie pozostałości sulfachloropirazyliny w tkankach indyków w aspekcie bezpieczeństwa konsumenta. XII Kongres PTNW “Od nauki do praktyki”, 18-20.09.2008, Olsztyn, str.114.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Burmańczuk A., Osypisk M., Klimont E. Zróżnicowanie poziomów pozostałości sulfachloropirazyliny w tkankach jadalnych drobiu. Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i Toksykologiczne Aspekty Działania Ksenobiotyków”, 24-25.06.2010, Olsztyn, str. 24-26. Wykład W7.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Burmańczuk A, Osypiuk M., Polska B. Variability in the sulfachloropyrazine residue values in the edible poultry tissues. 2nd International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (ICOPHA): “One Health for Sustainable Development”, 14–17.08.2013, Porto di Galinhas, Brazylia, str. 75.

W czasie trwania studiów doktoranckich nawiązałam współpracę zagraniczną z prof. Mario Giorgi, pracownikiem naukowym Zakładu Farmakologii i Toksykologii na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Pizie we Włoszech, który zaangażował mnie w projekt badawczy określający profil farmakokinetyczny tramadolu u psów po podaniu różnymi drogami.

Tramadol wydał się interesujący z punktu widzenia zastosowania w weterynarii, gdyż przez ostatnie dwie dekady stosowany był w leczeniu bólu u ludzi. Potwierdzono efektywność tramadolu

w przypadku zarówno analgezji pooperacyjnej jak również w przypadkach niechirurgicznych. Co więcej, tramadol obniża pooperacyjne zapotrzebowanie na morfinę, gdyż w wyższych stężeniach wywołuje silniejszą analgezję w kombinacji z dodatkiem morfiny, w porównaniu do leczenia samą morfiną. Ze względu zarówno na różne możliwe formułacje i drogi podania (dożylną (IV), domięśniową (IM), krople, czopki doodbytnicze, kapsułki szybko-uwalniające (IR-immediate release) się, długo-uwalniające się tabletki (SR- sustained release) jak i jego odmienną farmakokinetykę występującą u zwierząt, w stosunku do ludzi, zaobserwowano duży problem z właściwym ustaleniem odpowiedniej dawki, częstotliwością aplikacji jak i samego sposobu podania.

Przeprowadzone badania tramadolu po podaniu pięcioma różnymi drogami na psach, w których brałam udział, wykazały niespodziewane wyniki. Stwierdzono, że lek ten jest dużo szybciej metabolizowany u psów w porównaniu do ludzi i innych gatunków zwierząt, zwłaszcza kotów, jak również ilość poszczególnych metabolitów odpowiedzialnych za efekt przeciwbólowy jest różna, udowadniając dużo niższą jego skuteczność u tego gatunku. Tramadol podawany w postaci tabletek szybko uwalniających oraz czopków doodbytniczych nie wydaje się być z punktu widzenia farmakokinetyki wystarczająco efektywnym w leczeniu bólu u psów w dawce 100mg/psa. Skuteczność działania tramadolu w tych formułacjach leku jak i postaciach iniekcyjnych (IV i IM) wydaje się być optymalna przy podawaniu w/w dawki, co 1,5-2 h, natomiast w postaci tabletek długo uwalniających, co 6-8 h.

Wyniki opublikowano w 6 pracach w czasopismach z listy JCR:

- 5.1.4 Giorgi M., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. (2009) Pharmacokinetic evaluation of tramadol and its major metabolites after single oral sustained tablet administration in the dog: a pilot study. *Veterinary Journal* 180:253-255. (MNiSW2009 = 24; IF2009 = 2,323)
- 5.1.5 Giorgi M., Del Carlo S., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Saccomanni G. (2009) Pharmacokinetics of tramadol and its major metabolites following rectal and intravenous administration in dogs. *New Zealand Veterinary Journal* 57:146-152. (MNiSW2009 = 24; IF2009 = 1,205)
- 5.1.6 Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Turini V., Kowalski C. (2009) Biofarmaceutical profile of tramadol in the dog. *Veterinary Research Communication* 33:189-192. (MNiSW2009 = 15; IF2009 = 1,050)
- 5.1.7 Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. (2009) Pharmacokinetic and urine profile of tramadol and its major metabolites following oral immediate release capsules administration in dogs. *Veterinary Research Communication* 33:875-885. (MNiSW2009 = 15; IF2009 = 1,050)
- 5.1.8 Giorgi M., Del Carlo S., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Saccomanni G. (2010) Pharmacokinetics of tramadol and metabolites after injective administrations in dogs. *Polish Journal of Veterinary Science* 13:639-644. (MNiSW2010 = 20; IF2010 = 0,507)

Wyniki były również publikowane w innych recenzowanych czasopismach:

- 5.1.9. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Giorgi M., Saccomanni G. (2008) Tramadol – nowy analgetyk opioidowy w leczeniu bólu u zwierząt towarzyszących. *Magazyn Weterynaryjny* 18:1183-1188.

- 5.1.10. Del Carlo S., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Giorgi M. (2008) Farmacocinesi del tramadolo nel cane. Valutazione dopo somministrazione orale signola di compresse a rilascio prolungato. *Obiettivi & Documenti Veterinari* 2:49-55.
- 5.1.11. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Saccomanni G., Giorgi M. (2009) Farmakokinetyka tramadolu oraz jego głównych pochodnych po jednorazowym podaniu per os tabletki o przedłużonym uwalnianiu oraz czopków *per rectum* u psów. *Medycyna Weterynaryjna* 65:687-692. (MNiSW2009 = 6)
- 5.1.12. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Giorgi M., Saccomanni G. (2009) Zastosowanie tramadolu w postaci czopków u psów z punktu widzenia farmakokinetyki. *Magazyn Weterynaryjny* 18:1118-1121.
- 5.1.13. Del Carlo S., Turini V., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Giorgi M. (2009) Somministrazione rettale di tramadolo nel cane: un aiuto nel trattamento del dolore? *Rivista Veterinaria* 23:9-18.
- 5.1.14. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Saccomanni G., Giorgi M. (2012) Zastosowanie tramadolu w iniekcji u psów. *Magazyn Weterynaryjny* 21:870-874. (MNiSW2012 = 3)

Oraz na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci wykładów i doniesień posterowych:

- Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. Tramadol rectal administration in dogs: A pharmacokinetic study. *Fourth International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM)*, 24-28.08.2008, Praga, Czechy, str. 88.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G. Can tramadol rectal administration be useful in dog`s pain management? A pharmacological study. *XII Kongres PTNW "Od nauki do praktyki"*, 18-20.09.2008, Olsztyn, str. 44.
- Kowalski C., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Saccomanni G., Giorgi M. Differences in concentrations of tramadol and its major metabolites after *per os* sustained release tablet or *per rectum* suppository application. *VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku*, 10 – 12.05.2010, Zakopane, str. 60.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Giorgi M. Farmakokinetyka tramadolu u różnych gatunków zwierząt. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”*, 11-14.12.2012, Krynica Zdrój, str. 25. Wykład W8.

Brałam także aktywny udział w realizacji kilku badań na zlecenie firm farmaceutycznych dotyczących określenia profilu farmakokinetycznego oraz oznaczania pozostałości antybiotyków w materiale biologicznym pozyskiwanym od zwierząt. Efektem prowadzonych badań jest jedna publikacja w recenzowanym czasopiśmie:

- 5.1.15. Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.**, Sławik T. (2007) Determination of oxytetracycline in biological matrix. *Acta Polonice Pharmaceutica. Drug Research* 64:277-280. (MNiSW2007 =4)

Pozostałe wyniki prezentowane były na konferencjach krajowych w postaci doniesień posterowych:

- Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.** Determination of OTC in biological matrices. *The fifth Multidisciplinary Conference on Drug Research. 15-17.05.2006, Darłówko Wschodnie* str. 57.
- Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.** Pozostałości sulfadiazyny oraz trimetoprimu w jadalnych tkankach warchlaków. *III Konferencja szkoleniowa „Immunologia i Immunotoksykologia” Naturalne i syntetyczne modulatory odpowiedzi immunologicznej i angiogenezy. 2-3.06.2006, Jurata*, str. 35.
- Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.** Oznaczanie erytromycyny w osoczu po jej zastosowaniu w dawkach terapeutycznych. *Symposium: Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych 21-22.09.2006, Lublin*, str. 65-66.
- Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. Oznaczanie stężenia tylozyny w osoczu z wykorzystaniem techniki HPLC. *Symposium: Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych 21-22.09.2006, Lublin*, str. 67-68.
- Burmańczuk A., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Klimont E., Polska B., Osypiuk M. Kontrola pozostałości ampicyliny i kloksacyliny po podaniu dowymieniowym. *V Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Wpływ ksenobiotyków i zagrożeń cywilizacyjnych na mechanizmy odporności i angiogenezy oraz możliwości zapobiegania”, 28-30.05.2009, Jurata*, str. 13.

Zwieńczeniem tego etapu moich badań było uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych decyzją rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w dniu 16 listopada 2009 roku na podstawie pracy *„Różnice w wartościach stężeń sulfachloropirazyny oznaczonych techniką HPLC w tkankach kurcząt i indyków w aspekcie wyznaczenia okresu karencji”*, której promotorem był prof. dr hab. Cezary Jacek Kowalski.

Warto podkreślić, że jestem laureatem (3 miejsce) nagrody, stypendium naukowego dla doktorantów, wspieranego przez Urząd Marszałkowski i Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki - Regionalne Strategie Innowacji 8.2.2. w latach 2008/2009, za w/w pracę doktorską.

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych zostałam zatrudniona w Zakładzie Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, kierowanym przez prof. dr hab. Cezarego Jacka Kowalskiego, w którym pracuję do chwili obecnej.

Zachęcona ciekawymi wynikami wcześniejszych badań farmakokinetycznych we współpracy z Zakładem Farmakologii i Toksykologii na Uniwersytecie w Pizie, charakter moich zainteresowań naukowych skupił się na kontynuacji, wspólnych z międzynarodowym zespołem, badań profilu farmakokinetycznego leków przeciwbólowych a także przeciwbakteryjnych u różnych gatunków zwierząt.

Pierwszy kierunek badań dotyczy poszukiwania leków przeciwbólowych, których silne działanie przeciwbólowe stwierdzone u ludzi, bądź innych gatunków zwierząt, nie byłoby obarczone szeregiem działań niepożądanych zwłaszcza u zwierząt towarzyszących takich jak pies i kot. Natomiast przeprowadzona ocena profilu farmakokinetycznego umożliwi precyzyjniejsze oszacowanie dawki zarówno efektywnej jak i bezpiecznej dla gatunku badanego. W tym obszarze brałam udział w trzech badaniach:

1. określeniu profilu farmakokinetycznego tapentadolu u kotów (5.2.1)
2. określeniu profilu farmakokinetycznego flupirtyny u psów i kotów (5.2.2)
3. określeniu wpływu pożywienia oraz dawki na profil farmakokinetyczny cymikoksybu u psów (5.2.3)

Ze względu na poszerzający się udział na rynku światowym mleka koziego, jako alternatywy dla produktów krowich, w ostatnich latach zainteresowanie farmakologów kieruje się na gatunek kozy domowej w aspekcie oceny parametrów farmakokinetycznych a także określenia pozostałości w mleku stosowanych leków przeciwbakteryjnych oraz przeciwbólowych. Na tym polu brałam udział w kolejnych 2 międzynarodowych badaniach:

4. określeniu profilu farmakokinetycznego meloksykamu u kozy domowej wraz z określeniem pozostałości w mleku (5.2.4)
5. określeniu profilu farmakokinetycznego metamizolu u kozy domowej wraz z określeniem pozostałości w mleku (5.2.5)

5.2.1. Klasyczni silni agoniści receptorów opioidowych cechują się poważnymi działaniami niepożądanymi, dlatego też, atypowe leki opioidowe jak np. tapentadol (TAP), stały się bardzo popularne w praktyce klinicznej zwierząt towarzyszących. TAP stosowany jest klinicznie u ludzi od 2011 roku, w łagodzeniu bólu o nasileniu łagodnym do umiarkowanego, jednocześnie wykazuje słabe nasilenie działań niepożądanych w porównaniu do równoważnych dawek morfiny. TAP przyciągnął uwagę świata weterynarii, ponieważ jego powinowactwo do receptora opioidowego μ jest 50-krotnie słabsze niż morfiny, ale 120 razy silniejsze od tramadolu. Dodatkowo, jego drugi synergistyczny mechanizm działania wydaje się nie włączać inhibicji zwrotnego wychwytu 5-HT, redukując w ten sposób możliwość wystąpienia „zespołu serotoninowego”, działania niepożądanego charakterystycznego dla szybkiej dożylniej iniekcji np. tramadolu. Zważywszy, że zwłaszcza w medycynie weterynaryjnej skuteczność leków opioidowych wydaje się mieć związek z drogą podania, celem badania opisującego profil biofarmaceutyczny tapentadolu u kotów, była próba wyboru najlepszej drogi podania u tego gatunku.

Badanie wykonano na sześciu klinicznie zdrowych kotach, samcach (n=4) i samicach (n=2) rasy europejskiej, w wieku 3-6 lat i masie ciała w zakresie 3,4-4,8 kg. Zwierzęta zostały losowo podzielone na 3 grupy doświadczalne zgodnie z otwartym, jednodawkowym, modelem badania *cross-over*, w potrójnym układzie leczenia. Wszystkie zwierzęta zostały przegłodzone przez 12 h przed rozpoczęciem doświadczenia. Kotom z grupy I (n=2), TAP w dawce 5mg/kg podano poprzez iniekcję dożylną (IV). Grupa II (n=2) otrzymała TAP w tej samej dawce w postaci iniekcji domięśniowej (IM). Natomiast grupa III (n=2) otrzymała iniekcję podskórną. Dawka została ustalona na podstawie danych literaturowych opisujących skuteczność TAP u ludzi, zwierząt laboratoryjnych oraz psów. Zastosowano 1 tygodniowy okres karencji pomiędzy kolejnymi etapami.

Stężenia TAP w osoczu oznaczono z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody HPLC z detekcją fluorescencyjną, którą poddano walidacji dla osocza kota. Zmiany stężenia TAP w funkcji czasu oraz parametry farmakokinetyczne oceniano stosując analizę niekompartmentową.

Stwierdzone działania niepożądane, były bardzo podobne do tych zaobserwowanych po podaniu TAP u psów. Jednakże u kotów wystąpiło pobudzenie, podczas gdy u psów zaobserwowano uspokojenie i otępienie. Podobne zachowanie opisano również zarówno u kotów jak i psów po podaniu morfiny. Działania niepożądane były silniej wyrażone i trwały znacznie dłużej po podaniu IV w porównaniu do podania IM i SC. Jest to prawdopodobnie wynik szybkiego osiągnięcia przez TAP wysokiego stężenia we krwi po podaniu tą drogą. Jednakże żadne zwierzę nie wymiotowało, co jest charakterystyczne dla podania morfiny u kotów.

Ponieważ wcześniej opisane działania niepożądane TAP u psów oraz ludzi są zależne od dawki, mniejsza dawka zastosowana u kotów może zminimalizować występowanie niekorzystnych efektów TAP przy zachowaniu pełnej skuteczności przeciwbólowej.

Zarówno stężenia w osoczu jak i parametry farmakokinetyczne wykazały zmienność wewnątrz- oraz zewnątrzgrupową, co potwierdzają wcześniejsze doniesienia na temat opioidów.

Stężenia leku w osoczu po podaniu IV były podobne do uzyskanych u królików po podaniu tej samej dawki. Z drugiej strony, okres wykrywalności TAP w osoczu był dłuższy w porównaniu do opisywanych u psów (6 h) i królików (4 h), choć dawka była odpowiednio: niższa i równa do zastosowanej w niniejszym doświadczeniu. Zgadza się to także z dłuższym okresem półtrwania w fazie eliminacji, w porównaniu do psów (~1 h) czy królików (0,52 h). Proces glukuronidacji jest główną drogą metabolizmu TAP u ludzi, gdzie 83% dawki doustnej jest konwertowane i wydalane jako nieaktywny metabolit. Należy pamiętać, że koty mają ograniczoną ilość UDP-glukuronylotransferazy, co może tłumaczyć różnice w wartościach $T_{1/2z}$ pomiędzy gatunkami.

Biodostępność dla podania IM i SC była duża i podobna do uzyskanych we wcześniejszych badaniach atypowych leków opioidowych. Pomimo, że stwierdzono niższą, średnią wartość parametru C_{max} po podaniu SC, różnica w biodostępności w porównaniu do podania IM nie okazała się być statystycznie znacząca. Podanie SC faktycznie wywołało efekt *depot* zatrzymując lek w miejscu podania i hamując jego zbyt szybką eliminację poprzez stopniowe jego uwalnianie, niż po podaniu IM, co było szczególnie widoczne w krzywych farmakokinetycznych poszczególnych osobników. Przedłużyło to fazę eliminacji TAP (jednakże nie znacząco), co miało pozytywny wpływ na wartość AUC. Takie zachowanie może również tłumaczyć słabiej wyrażone działania niepożądane w grupie zwierząt, która otrzymywała lek drogą SC w porównaniu do pozostałych badanych iniekcyjnych dróg podania.

Minimalne stężenie efektywne u ludzi zostało oszacowane na 0,67 $\mu\text{M/l}$, co odpowiada 148 ng/ml. Jeśli założymy u kotów w/w MEC, to stężenie w osoczu oznaczone w niniejszym badaniu przekraczało wspomnianą wartość przez co najmniej 3 h. Jednakże ekstrapolacja wartości MEC z człowieka na zwierzęta nie wydaje się być miarodajna, gdyż istnieją dane literaturowe świadczące o możliwości wystąpienia różnic pomiędzy stężeniem w osoczu a właściwym działaniem na poziomie samego receptora. Przykładowo TAP wydawał się być efektywny w leczeniu bólu u królików przez co najmniej 10 h po podaniu IV w dawce 5mg/kg pomimo, że jego stężenie w osoczu osiągało wartość MEC tylko przez 2 h.

Podsumowując, było to pierwsze badanie dotyczące profilu biofarmaceutycznego tapentadolu u kotów. Otrzymane wyniki sugerują odmienne cechy farmakokinetyczne TAP u kotów w porównaniu do innych gatunków zwierząt. Jednocześnie, TAP wydaje się być obiecującym nietypowym lekiem opioidowym w terapii bólu u kotów po podaniu wszystkimi trzema badanymi drogami iniekcyjnymi (IV, IM i SC), zwłaszcza w kontekście zwierząt wrażliwych na działania niepożądane, obserwowane po podaniu innych opioidów.

Wyniki tego badania przedstawiono w 1 publikacji w czasopiśmie z listy JCR:

- 5.2.1. Lee H.K., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kim T.W., Kowalski C., Giorgi M. (2013) Pharmacokinetics of the novel atypical opioid tapentadol after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in cats. *Veterinary Journal* 198:620-624. (MNI_{SW}2013 = 45; IF2013 = 2,165)

Oraz zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci wykładów i doniesień posterowych:

- Lee H.K., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kim T.W., Kowalski C.J., Giorgi M. Pharmacokinetics of the novel atypical opioid tapentadol after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in cats. *Atti S.I.S.Vet. LXVII, 14-15.09.2013, Brescia, Włochy*, str. 171.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lee H., Kim T., Kowalski C.J., Lisowski A., Giorgi M. Farmakokinetyka tapentadolu po podaniu doustnym u kotów, *III Konferencja Naukowa pt.: „Postępy w medycynie i farmakoterapii”, 10-13.12.2013, Karpacz*, str. 53.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lee H., Kim T., Kowalski C.J., Lisowski A., Giorgi M. Farmakokinetyka tapentadolu po podaniu domięśniowym u kotów. *III Konferencja Naukowa pt.: „Postępy w medycynie i farmakoterapii”, 10-13.12.2013, Karpacz*, str. 56.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Lee HK., Kim TW, Lisowski A., Meizler A., Mills P.C., Giorgi M. Tapentadol w terapii przeciwbólowej małych zwierząt. *IV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa “Innowacje w medycynie i farmakoterapii”, 8-11.03.2016, Zakopane*.

5.2.2. Ciekawe mechanizmy działania przeciwbólowego, zwróciły uwagę farmakologów weterynaryjnych na Flupirtynę (FLU), która należy do klasy antagonistów N-metylo-D-asparaginianu (NMDA), chociaż również w tej klasie uważa się ją za nietypową. FLU współdziałała ze sprzężonymi z białkiem G kanałami potasowymi (GIRK), ale poprzez wpływ jonów potasowych w komórkach (aktywacja kanałów KCNQ) stabilizuje ich potencjał spoczynkowy i zmniejsza aktywację błon komórek nerwowych. Ponadto FLU hamuje pośrednio receptor NMDA, podczas gdy blokada Mg^{2+} na tym receptorze pozostaje niezmienną. Ponieważ związek ten selektywnie wchodzi w interakcję z neuronalnym K^+ , FLU okrzyknięto prototypem nowej klasy leku, tzw. związków selektywnie otwierających neuronalny kanał potasowy (Selective Neuronal Potassium Channel Openers w skrócie. SNEPCO).

W stężeniach terapeutycznych FLU nie wykazuje aktywności wobec receptorów adrenergicznych 1 i 2, 5HT₁, 5HT₂, dopaminergicznych, benzodiazepinowych, opioidowych, ośrodkowych muskarynowych i nikotynowych. Co więcej, jej działanie jako środka rozluźniającego mięśnie stanowi dodatkową wartość w przypadkach związanych ze wzrostem napięcia mięśni, takich jak ból układu mięśniowo-szkieletowego kręgosłupa czy bólu mięśniowo-powięziowego i bólach napięciowych. Jednocześnie posiada udowodnione właściwości neuroprotekcji poprzez silne działanie przeciwutleniające a także podnosi poziom glutationu, przy którego niedoborze nasila się apoptoza komórek. Jest to informacja bardzo ważna przy stosowaniu FLU u gatunków, u których związek ten występuje w nikłych ilościach, jak ma to miejsce np. u kotów.

Chociaż istnieje znaczna liczba dowodów na skuteczność FLU u ludzi, mało jest badań nad jej działaniem przeciwbólowym u zwierząt. Najwięcej jest doniesień zastosowania FLU u zwierząt laboratoryjnych ale jej farmakokinetyka opisana była wyłącznie u osłów i koni.

Warto podkreślić, że FLU jest metabolizowana w wątrobie do dwóch głównych metabolitów, kwasu 4-fluoro-hipurowego tzw. M1 oraz N-acetylowanego analogu D13223. Jedynie pierwszy metabolit jest czynny farmakologicznie (około 30% siły przeciwbólowej macierzystego leku), co z punktu widzenia ekstrapolacji dawki może mieć kluczowe znaczenie w osiągnięciu MEC. Ponadto, FLU nie wydaje się ulegać metabolizmowi z udziałem cytochromu P450; jednocześnie uważa się, że ludzkie izoenzymy oksydazy monoaminowej również prawdopodobnie nie uczestniczą w metabolizmie leku *in vivo*. Z drugiej strony, ludzka mieloperoksydaza i peroksydaza chrzanowa powodują szybki metabolizm FLU, co sugeruje, że lek ten jest doskonałym substratem dla tych szlaków enzymatycznych. Te dane umożliwiły wysuniecie hipotezy odnośnie odmiennej farmakokinetyki flupirtyny u zwierząt, zwłaszcza u kotów.

Celem tego badania była ocena profilu farmakokinetycznego FLU po podaniu różnymi drogami u kotów (dożylnie –IV; doustnie, w kapsułce o natychmiastowym uwalnianiu- POIR) a także u psów (IV; POIR; doustnie, w kapsułce o przedłużonym uwalnianiu - POPR oraz doodbytniczo - RC).

W pierwszym etapie, 6 kotów rasy europejskiej podzielono losowo na dwie równoliczne grupy (badanie dwuetapowe, sparowane, naprzemienne – *cross over*). Grupa 1 otrzymała pojedynczą dawkę 5 mg/kg FLU w postaci iniekcji IV. Grupa 2 otrzymała taką samą dawkę, podaną doustnie - POIR.

W drugim etapie, 6 psów rasy Labrador przydzielono losowo do czterech grup (układ czteroetapowy, sparowany, naprzemienny – *cross over*). Zwierzęta w grupach 1, 2 i 4 otrzymały pojedynczą dawkę FLU (5 mg/kg) podawaną odpowiednio IV, POIR i RC. Grupa 3 otrzymała pojedynczą dawkę FLU, 200 mg/ psa, doustnie - POPR. Okres karencji pomiędzy kolejnymi etapami u obu gatunków wynosił 1 tydzień.

Stężenia FLU oznaczono z wykorzystaniem wcześniej zwalidowanej pod kątem analizy osocza psa i kota techniki HPLC z detekcją fluorescencyjną. Do opisu profilu farmakokinetycznego kotów wykorzystano model dwukompartментowy. Natomiast u psów, model niekompartментowy.

Zastosowana dawka 5 mg/kg (IV, POIR i RC) oraz 200 mg/psa (POPR) była trzykrotną minimalną dawką stosowaną u ludzi (100 mg/osobę). Jednocześnie była nadal w zakresie klinicznej dawki przeznaczonej dla ludzi (100-400 mg/osobę/dzień). Wybór zastosowanej dawki potwierdzały również wyniki oceny ED₅₀ FLU po podaniu doustnym w teście elektrycznej stymulacji miazgi zębowej zarówno u psów jak i kotów (odpowiednio, 3,5 i 3 mg/kg).

Należy podkreślić, że podczas badania nie stwierdzono działań niepożądanych u kotów. U psów jedynie w grupie IV odnotowano ślinienie, drgawki i wymioty, które ustępowały samoistnie w ciągu 10 minut. Można to wytłumaczyć szybkim osiągnięciem wysokich stężeń FLU w osoczu w pierwszych minutach od podania.

U kotów stężenie FLU w osoczu wykryto we wszystkich badanych grupach przez 36 h od podania leku. U psów po podaniu doustnym, stężenia FLU w osoczu były niższe niż te po podaniu dożylnym (do 36 h), ale były wykrywalne w tym samym przedziale czasowym.

U kotów wartości klirensu i objętości dystrybucji po podaniu PO nawet po ich normalizacji dla biodostępności były inne niż po podaniu dożylnym, co wskazuje, że zarówno forma leku dla podania IV i PO (zastosowano FLU w formie odpowiednio: D-glukonianu i maleinianu) jak i nasycenie enzymów metabolicznych (wywołane przez wysokie stężenia leku w grupie IV), może wygenerować takie różnice.

U ludzi, po podaniu PO 100 mg FLU, średni okres półtrwania w fazie eliminacji wynosił 6,5 h i był zgodny z wartościami uzyskanymi w badaniu u psów, podczas gdy u kotów czas ten uległ wydłużeniu dwukrotnie (13,6 h). Jest to związane ze zmniejszonym klirensem u kotów, w porównaniu do ludzi. Wydłużony okres półtrwania u kotów jest więc, prawdopodobnie następstwem wolniejszej lub w ogóle brakiem biotransformacji do N-acetylowanego analogu D13223, który jest stwierdzany u ludzi. Wskazuje na to brak u kotów jednego z dwóch enzymów N-acetylo-transferazy (NAT2), który u ludzi odpowiada za tworzenie metabolitu D13223.

Biodostępność po podaniu doustnym u kotów wyniosła około 40%, podczas gdy u psów po podaniu doustnym POIR, POPR i RC wynosiła odpowiednio: 41,93%, 36,78% i 29,43%. Warto jednak zauważyć, że u kotów (pomimo niskiej doustnej biodostępności) dawka 5 mg/kg po podaniu PO wytworzyła stężenia w osoczu wyższe niż wytwarzane przez kliniczną dawkę po podaniu PO (100 mg/osobnika) zgłaszaną u ludzi.

Formulacje o zmodyfikowanym uwalnianiu wydają się u psów sugerować szereg zalet, jak wydłużenie interwałów podawania oraz zmniejszenie występowania działań niepożądanych związanych z gwałtownym wzrostem osoczowych stężeń i nawrotach tych objawów (ze względu na gwałtowny spadek po szczycie stężenia w osoczu). Jednakże u psów stwierdzono zaskakujący profil farmakokinetyczny po podaniu POPR, który był prawie identyczny z podaniem POIR.

Główne uzasadnienie stosowania czopków w medycynie ludzkiej to unikanie efektu pierwszego przejścia spowodowanego wysokim klirensem wątrobowym. FLU ma minimalny wpływ na klirens wątrobowy u ludzi, dlatego główną korzyścią tej postaci jest szybka absorpcja do krążenia ogólnoustrojowego. W niniejszym badaniu, podanie FLU drogą RC spowodowało osiągnięcie niższych osoczowych stężeń (635,34 ng/ml) i $F = 29,43\%$ (najniższa spośród badanych formulacji). Klirens wątrobowy flupirtyny u psów jest nieznan, jednakże ze względu na specyficzną budowę ostatniego odcinka jelita grubego, można się spodziewać sekwestracji czopka oraz jego niekontrolowanej migracji dogłowowo a następnie przyspieszonego metabolizmu i w konsekwencji niskiej biodostępności. Wcześniejsze badania wykorzystujące czopki również wykazały zmniejszoną biodostępność u psów.

Podsumowując, profile farmakokinetyczne FLU u psów i kotów, różniły się nieznacznie w porównaniu do uzyskanych u ludzi. Chociaż podanie doustne wykazało niższą biodostępność niż ta stwierdzona u ludzi, dawka 5 mg FLU/kg podana w kapsułce o natychmiastowym uwalnianiu-POIR zarówno u kotów jak i psów, oraz dawka 200 mg/zwierzę po podaniu doodbytniczym psów osiągały podobne wartości stężeń w osoczu do opisanych u ludzi po podaniu dawki klinicznej. Konieczne są dalsze badania farmakokinetyczno-farmakodynamiczne w celu oceny klinicznej skuteczności FLU zarówno u kotów jak i psów.

Wyniki tych badań przedstawiono w 2 publikacjach w czasopismach z listy JCR:

- 5.2.2.a. De Vito V., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Owen H., Kowalski C.J., Giorgi M. (2014) Pharmacokinetic profiles of the analgesic drug flupirtine in cats. *Veterinary Journal* 202:309-13. (MNI_{SW}2014 = 45; IF₂₀₁₄ = 1,693)

5.2.2.b. De Vito V, **Lebkowska-Wieruszewska B**, Shaban A, Kowalski CJ, Lisowski A, Giorgi M. (2015) Pharmacokinetic profiles of the analgesic drug flupirtine in dogs after the administration of four pharmaceutical formulations. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42:629-637. (MNiSW2015 = 35; IF2015 = 1,485)

A także zaprezentowano na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci wykładów i doniesień posterowych:

- De Vito V., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Shaban A., Kowalski C.J., Lisowski A., Giorgi M. Pharmacokinetics and disposition of flupirtine after administration of four different formulations in dogs. *Societa' italiana delle scienze veterinarie, lxxviii convegno nazionale Sisvet, CONVEGNO SICV, XI CONVEGNO Aipvet, XII CONVEGNO SIRA, 16-18 Giugno 2014, Pisa, Włochy*, str. 21.
- De Vito V., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Owen H., Kowalski C.J., Giorgi M. Pharmacokinetics of flupirtine in healthy cats following oral and intravenous administrations. *Societa' italiana delle scienze veterinarie, lxxviii convegno nazionale Sisvet, CONVEGNO SICV, XI CONVEGNO Aipvet, XII CONVEGNO SIRA, 16-18 Giugno 2014, Pisa, Włochy*, str. 173.
- De Vito V., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Shaban A., Owen H., Kowalski C.J., Lisowski A., Giorgi M., Pharmacokinetics of flupirtine in dogs and cats. International Conference "Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humans" 19–20.09.2014, Lublin, Wykład.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, De Vito V., Owen H., Shaban A., Lisowski A., Kowalski C.J., Giorgi M. Flupirine in small animals pain management. *XV Kongres PTNW 22–24.09.2016, Lublin*, str. 170.

5.2.3. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) wiodą prym wśród leków przeciwbólowych w medycynie weterynaryjnej, stąd też w ostatnich latach zainteresowanie farmakologów weterynaryjnych skierowało się na selektywne inhibitory COX-2.

Pomimo, że istnieje stosunkowo wiele danych literaturowych odnośnie inhibitorów COX-2 przeznaczonych zarówno dla ludzi, jak i wykorzystywanych w medycynie weterynaryjnej, żadne z badań nie podejmuje oceny profilu farmakokinetycznego cymikoksybu (CX) u psów w zależności od wypełnienia przewodu pokarmowego czy różnic w dawce.

Poprzednie badania nad innym inhibitorem COX-2, celekoksybem wykazały, że pokarm może wpływać na profil farmakokinetyczny tej grupy leków. Stwierdzono, że wraz z wysoką zawartością tłuszczu w diecie zwiększa się wchłanianie leku w porównaniu do zwierząt kontrolnych będących na czczo czy na diecie ubogotłuszczowej. W niniejszym badaniu posiłek był przygotowany tak, aby zasymulować normalną sytuację. Wykorzystana karma była komercyjną mięsną karmą w puszcze, dostępną dla każdego właściciela potencjalnego pacjenta.

Uzasadnieniem przeprowadzenia badań była również próba oceny wpływu uśrednionej dawki cymikoksybu na różne populacje, gdzie występowały duże różnice w masie ciała psów, rasie czy warunkach osobniczych itd., w odniesieniu do dawki precyzyjnej (2 mg/kg) podawanej psom rasy Beagle, o stosunkowo jednorodnej genetycznie populacji, w podobnym wieku, masie ciała i warunkach eksploatacji. Takie postępowanie jest szczególnie wartościowe dla oceny leków stosowanych w leczeniu bólu i stanów zapalnych, ponieważ leczenie jest często długotrwałe i może

być dowolnie przerywane bez obawy o wysoką częstotliwość występowania działań niepożądanych. Podobnie jak inne inhibitory COX, CX jest oferowany w postaci doustnej tabletki do żucia (smakowa), co umożliwi bezstresowe aplikowanie przez właściciela. Chociaż postać tabletki do żucia ma zalety łatwości podawania, ma również tę wadę, że nie pozwala na precyzyjne dawkowanie. W przypadku tabletek do żucia dokładne dawkowanie można osiągnąć jedynie poprzez podział tabletki na podstawie masy ciała, który jest procesem żmudnym, a i tak często bywa niedokładnym. Tak więc powszechną praktyką w leczeniu zwierząt jest stosowanie tego typu produktów w zakresie mas o tej samej dawce, osiągając w przybliżeniu dawkę zalecaną. Stąd też badanie zostało zaprojektowane tak, aby także określić także zakres dawkowania u psów, by leczenie było w pełni skuteczne.

Badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie brało udział pięć zdrowych dorosłych samców rasy Beagle o masie ciała 9-12 kg, w wieku 4-5 lat. Psy otrzymywały CX w dawce precyzyjnie określonej tj. 2 mg/kg doustnie (PO), na czczo - po 12 h przegłodzenia przez noc. Indywidualnie dobrane dawki zostały przygotowane przez precyzyjny podział tabletki.

W drugim etapie wykorzystano sześć zdrowych psów rasy Labrador retriever o masie ciała 32-41 kg, w wieku od 2 do 4 lat, które zostały losowo podzielone na 2 grupy doświadczalne. Każde zwierzę otrzymało jednorazowo cymikoksyb w dawce przybliżonej tj. 80 mg/psa. Jednakże pierwsza grupa (n=3) otrzymała lek rano na czczo - po 12 h, nocnym przegłodzeniu, natomiast drugiej grupie (n=3) podano lek również rano, ale po 15 minutach od nakarmienia karmą komercyjną. Po 2-tygodniowym okresie karencji, grupy zamieniono (grupa nakarmiona stała się grupą przegłodzoną i odwrotnie) i powtórzono doświadczenie.

Stężenia cymikoksybu oznaczono techniką HPLC z detekcją florescencyjną zgodnie z metodą analityczną wcześniej opublikowaną (Giorgi i wsp., 2013). Zmiany stężenia CX oceniano stosując analizę 1-kompartmentową.

Po podaniu CX w dawce 2 mg/kg w doświadczeniu na Beaglach, stwierdzono zarówno dla parametru T_{max} , jak i okresu półtrwania w fazie eliminacji wartość równą ok. 2,9 h. Wcześniejsze badania wykazały, że w przypadku podania CX (1 mg/kg) doustnie, jednorazowo psom rasy Beagle wartości T_{max} były podobne (2 h), jednakże nie w przypadku $t_{1/2\alpha}$ (7 h). Ta różnica w okresie półtrwania odnotowana została również w raporcie EMA/CVMP (2011) dotyczącym CX, gdzie parametr ten wynosił około 2,5-4 h u psów z normalnym metabolizmem oraz ponad 8 h u Beagli ze zwolnionym metabolizmem. Wydaje się zatem, że dawka CX powinna być zmniejszona u psów z zaburzeniami czynności wątroby.

Wyniki drugiego doświadczenia (u psów na czczo), okazały się bardzo podobne do wyników uzyskanych po podaniu precyzyjnej dawki 2 mg/kg, jaką zastosowano w doświadczeniu 1. Nasuwa się więc wniosek, że orientacyjne dawkowanie oraz różnice rasowe nie wydają się mieć znaczącego wpływu na parametry farmakokinetyczne. MEC dla psów określono na 0,2 µg/ml, co potwierdza w/w raport EMA/CVMP. Symulacja podawania CX doustnie w dawce 1,95; 2,00 i 2,50 mg/kg wykazała obecność w osoczu stężenia leku na poziomie MEC w zakresie 8,3-9,4 h.

Otrzymane wyniki wykazały, że parametry farmakokinetyczne cymikoksybu u psów po podaniu dawki precyzyjnej (2 mg/kg) i dawki przybliżonej (1,95-2,5 mg/kg) były podobne, niezależnie od dawki i wypełnienia przewodu pokarmowego (na czczo czy po nakarmieniu). Czas trwania minimalnego skutecznego stężenia (MEC), okazał się podobny po podaniu wszystkich badanych dawek.

Wyniki tych badań przedstawiono w czasopismach z listy JCR:

5.2.3.a. Kim T.W., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Owen H., Hyoin Yun, Kowalski C.J., Giorgi M. (2014) Pharmacokinetic profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. *Veterinary Journal* 200:77-81. (MNiSW2014 = 45; IF2014 = 1,693)

5.2.3.b. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Kim T.W., Owen H., Yun H., Giorgi M. (2015) Wpływ pokarmu oraz sposobu dawkowania na farmakokinetykę cymikoksybu u psów. *Medycyna Weterynaryjna* 71:626-631. (MNiSW2015 = 15; IF2015 = 0,195)

A także zaprezentowano na konferencjach międzynarodowych w postaci posterów:

- Kim T.W., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Giorgi M. Pharmacokinetic profiles of cimicoxib. *Atti S.I.S.Vet. LXVII, 14-15.09.2013, Brescia, Włochy*, str. 178.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, C.J. Kowalski, T.W. Kim, H. Owen, Hyoin Yun, M. Giorgi. Czy obecność pokarmu może wpływać na stężenia cymikoksybu w osoczu u psów? *International Conference "Current Approaches to Health and Diseases in Animals and Humans" 19-20.09.2014, Lublin*, str. 117.

5.2.4. Wytwarzanie produktów pochodzenia zwierzęcego bezpiecznych dla ludzi jest jedną z najważniejszych kwestii tego stulecia. Z drugiej jednak strony społeczeństwo stopniowo staje się coraz bardziej świadome potencjalnego cierpienia zwierząt hodowlanych i konieczności stosowania nowych terapii przeciwbólowych zarówno w celu zapobiegania jak i leczenia bólu. W związku z tym istnieje zapotrzebowanie na nowe leki łączące ból również u zwierząt produkcyjnych.

Pomimo że hodowla kozy domowej jest obecna na całym świecie w ilościach wystarczająco dużych, aby nadać im status ważnego gatunku produkcyjnego, zwierzęta te są nadal uważane przez agencje ds. żywności w Europie i USA za mało znaczące. Ze względu na mniejszą liczbę populacji kóz w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt, okrojona liczba badań i dostępnych danych wszelkie problemy zdrowotne nie mogą być rozwiązywane za pomocą niewielkiej ilości leków zatwierdzonych przez EMA lub FDA. W związku z tym wiele leków podaje się kozom w sposób *off - label use* (poza wskazaniami na ulotce), bez żadnych informacji naukowych na temat zachowania leku w organizmie, potencjalnej toksyczności i odpowiednich okresów karencji dla produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi.

Co więcej, ostatnio koza domowa stała się zwierzęciem towarzyszącym, które wykazuje silne podobieństwo z innymi zwierzętami towarzyszącymi, takimi jak psy i konie, w zachowaniach komunikacyjnych z człowiekiem. Terapia przeciwbólowa nieobarczona działaniami niepożądanymi, staje się zatem istotnym elementem w wykonywaniu działań lekarskich takich jak wspomaganie porodu czy usuwanie rogów, które jest wyjątkowo bolesne i może wywoływać skrajny stres z nadpobudliwością. Pomimo że, istnieje tendencja do działań promujących bezpieczeństwo i dobrostan zwierząt, często również względy ekonomiczne ograniczają stosowanie środków przeciwbólowych tym bardziej, że istnieje tylko niewielka liczba zarejestrowanych leków dla kóz.

Meloksykam (MEL) jest silnym lekiem przeciwzapalnym o właściwościach przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Wykazano, że MEL preferencyjnie hamuje COX-2 (12 razy bardziej selektywnie jako inhibitor COX-2 u psów) niż izoenzym COX-1.

Profil farmakokinetyczny MEL wykazuje dobrą absorpcję, dłuższy okres półtrwania i wysoką dostępność biologiczną po podaniu pozanaczyniowym u różnych gatunków zwierząt. Brak jest jednak danych farmakokinetycznych odnośnie zastosowania meloksykamu u kozy po podaniu domięśniowym oraz na temat pozostałości tego leku w mleku. Cel zadania był zatem dwójaki: określenie farmakokinetyki MEL po podaniu dożylnym (IV) i domięśniowym (IM) w dawce 0,5 mg/kg u kozy domowej; oraz ilościowe oznaczanie pozostałości MEL w mleku.

Badanie przeprowadzono na sześciu zdrowych 1-2 letnich kozach mlecznych rasy mieszanej, o średniej wadze 55 (\pm 4) kg. Kozy zostały losowo przydzielone do 2 grup terapeutycznych (model badania otwartego, z jednorazowym podaniem, dwufazowego, niesparowanego, typu *cross-over* (2×2 *Latin square*). Grupa A (n=3) otrzymała pojedynczą dawkę 0,5 mg/kg MEL w postaci roztworu do wstrzykiwań dożylnie. Grupa B (n=3) otrzymała tę samą dawkę MEL przez wstrzyknięcie domięśniowe w prawy mięsień pośladkowy. Między fazami zastosowano 3-tygodniowy okres karencji, po czym grupy zamieniono i doświadczenie powtórzono. Próbkę krwi pobierano bezpośrednio przed i po 5, 15, 30 i 45 min oraz ; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 24; 36; 48; 60; 72; 96; 120; 144 i 168 h po podaniu leku. Ponadto, kozy były całkowicie zdajane z obu wymion bezpośrednio przed i w 10, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 i 168 h, po podaniu leku. Meloksykam oznaczono techniką HPLC–DAD, wykorzystując metodę analityczną wcześniej opublikowaną z niewielkimi modyfikacjami własnymi i zwalidowaną pod kątem analizy osocza kozy.

Do oceny farmakokinetyki użyto modelu dwukompartamentowego w przypadku podania dożylnego, natomiast dla podania domięśniowego najlepiej pasował model jednokompartamentowy.

Stężenia MEL w osoczu po podaniu IV i IM były wykrywalne do 96 h. Faza eliminacji MEL z osocza była podobna w obu badanych grupach. Nie wykazano, aby parametry farmakokinetyczne różniły się znacząco pomiędzy badanymi drogami podania, jak i danymi stwierdzonymi w podobnych badaniach u kóz. Przykładowo, okres półtrwania był długi ale nie różnił się statystycznie ($9,6 \pm 0,9$ h - IV vs. $9,3 \pm 0,7$ h - IM).

Biodostępność po podaniu IM wynosiła $105,0 \pm 8,23\%$. Wartość tę można wyjaśnić jako błąd doświadczalny, na który złożyły się różne fazy badania, choć istnieją badania w literaturze opisujące podobne zjawiska.

Stężenia MEL w próbkach mleka stwierdzano odpowiednio dla drogi podania IV i IM do 60 i 48 h od podania leku. Jak dotąd brak jest dozwolonych maksymalnych limitów pozostałości (MRL) meloksykamu dla mleka pozyskanego od kóz, choć tempo usuwania leku wydaje się być szybsze niż w przypadku bydła. Może to wynikać z bardziej aktywnego metabolizmu u kóz w porównaniu z owcami lub bydłem. Jest to związane z ich sposobem żywienia, gdyż kozy są naturalnymi „poszukiwaczami”, które mogą sięgać po różnorodną roślinność stojąc na tylnych łapach lub nawet wspinać się na drzewa. Kozy najchętniej jedzą liście drzew i krzewów, kwiaty i owoce, wybierając w ten sposób najbardziej dostępny pożywny pokarm. Są jednak także narażone na spożycie roślin zawierających wiele toksycznych alkaloidów, które następnie muszą być metabolizowane podlegając wątrobowemu efektowi pierwszego przejścia. W przeciwieństwie do bydła, które żywione jest bądź nieselektywną paszą z podajnika lub pasie się na nieselektywnych gatunkach traw na ogół o niskiej zawartości alkaloidów.

Wartości stężeń MEL w osoczu, w symulowanym stanie stacjonarnym, były wyższe niż MEC obliczony dla kotów (347 ng/ml) we wszystkich badanych punktach czasowych (do 24h), podczas gdy przy wartości MEC dla psów (833 ng/ml) przez 16 h. Reasumując, względnie długi okres półtrwania eliminacji, całkowita F po podaniu IM i wysoka wartość średniego stężenia w osoczu

w ciągu 24 h, obliczona po symulacji komputerowej sugerują, że lek może być podawany raz na dobę drogą IM u kozy domowej w terapii przeciwbólowej.

Podsumowując, MEL po podaniu IV i IM u kóz w okresie laktacji wykazał podobne profile farmakokinetyczne. Dawka 0,5 mg/kg zastosowana w badaniu symulacyjnym zapewnia stężenia w osoczu powyżej MEC, określone dla innych gatunków zwierząt, przez prawie 24 h. Wysoka dostępność biologiczna po podaniu IM, długi okres półtrwania w fazie eliminacji i średnie stężenie w osoczu w stanie stacjonarnym sugerują, że podanie MEL domięśniowo raz dziennie w dawce 0,5 mg/kg wydaje się być wystarczające, aby zapewnić skuteczne działanie przeciwbólowe. Wykazano, że stężenia pozostałości MEL w mleku kóz są w pewnym stopniu usuwane zgodnie z trendem stwierdzanym w badaniach na mleku krowim.

Wyniki powyższego badania opublikowano w czasopiśmie z listy JCR:

5.2.4. De Vito V., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lavy E., Lisowski A., Owen H., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetics of meloxicam in lactating goats (*Capra hircus*) and its quantification in milk after a single intravenous and intramuscular injection. *Small Ruminant Research* 160:38-43. (MNiSW2016 = 30; IF2017 = 0,974)

Oraz zaprezentowano na międzynarodowej konferencji w postaci posteru:

- Giorgi M., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lavy E., Lisowski A., Owen H., De Vito V. Pharmacokinetics of meloxicam in lactating goats (*Capra hircus*) after a single intravenous and intramuscular injection and its quantification in milk. *14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. "One Health – Challenges and Innovations"*, Wrocław 24-28.06.2018. P.11.2. (J. Vet. Pharmacol. Ther. 2018 Vol. 41 Suppl. 1 s. 132)

5.2.5. Zważywszy na zachęcające wyniki odnośnie profilu farmakokinetycznego meloksykamu u kóz, kontynuowałam międzynarodową współpracę nad wcześniej rozpoczętymi u psów i kotów, badaniami farmakokinetyki metamizolu u kozy domowej.

W dostępnej literaturze brak jest danych odnośnie farmakokinetyki aktywnych metabolitów MET u kóz. Doświadczenie to zostało wzbogacone określeniem pozostałości tego leku w mleku. Cele zatem tego badania obejmowały: a) zbadanie właściwości farmakokinetycznych dwóch głównych aktywnych metabolitów MET, MAA i AA u kóz po podaniu IV i IM; oraz b) określenie stężenia metabolitów MET w mleku kozim po podaniu IM.

Sześć zdrowych kóz w okresie laktacji w wieku ok. 5-8 lat i wadze 52-66 kg przydzielono losowo do dwóch równolicznych grup (badanie *cross over*). W grupie I - podanie dożylnie (IV), MET wstrzyknięto w postaci pojedynczego bolusa w dawce 25 mg/kg masy ciała. Zastosowana dawka, jest dawką zalecaną dla psów. Grupa II - podanie domięśniowe (IM) otrzymała taką samą dawkę w górny kwadrant mięśnia pośladkowego. Próbki krwi pobrano w 5; 15; 30; 45 min oraz 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10 i 24 h od podania leku. Próbki mleka pobierano po całkowitym zdajaniu z obu wymion w 1, 6, 12, 24, 48 i 72 h po podaniu leku. Po dwutygodniowym okresie karencji grupy zamieniono i doświadczenie powtórzono.

Przygotowanie próbek i analizę HPLC z detekcją UV przeprowadzono w oparciu o wcześniej opracowaną metodę zwalidowaną pod kątem analizy osocza oraz mleka kóz.

Analizę farmakokinetyczną dwóch głównych metabolitów MET przeprowadzono metodą niekompartmentową, zakładając całkowitą konwersję MET do MAA.

Nie zaobserwowano żadnych objawów niepożądanych u kóz po podaniu MET.

Po podaniu IV i IM, metabolit MAA był szybko wykrywalny w osoczu i utrzymywał się odpowiednio przez 6 i 10h. Po podaniu IV, średnie stężenie MAA w osoczu w 0,08 h (czas pobrania 1 próbki) wynosiło $183,97 \pm 1,46$ $\mu\text{g/ml}$ a po podaniu IM, C_{max} obserwowano w $0,70 \pm 0,06$ h. Szybka konwersja MET do MAA została potwierdzona maksymalnym stężeniem MAA już w pierwszym punkcie pomiarowym po podaniu IV. Może być to spowodowane bezpośrednim wprowadzeniem leku do krążenia ogólnoustrojowego, gdzie pomijana jest faza wchłaniania, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami. Jednocześnie, zgodnie z oczekiwaniami, podanie IM wykazało względnie opóźnione C_{max} dla MAA. Podobnie różnice stwierdzono w parametrach farmakokinetycznych w porównaniu do podania dożylnego. Tłumaczy to wpływ specyfiki gatunkowej na profile farmakokinetyczne, który już wcześniej zgłaszano u różnych gatunków zwierząt.

Objętość dystrybucji była większa po podaniu IM, choć ze znacząco mniejszą ($p < 0,05$) wartością klirensu niż po podaniu IV. Spośród innych gatunków, kozy po podaniu IV, wykazały najkrótszy okres półtrwania w fazie eliminacji (0,72 h), który był aż 9 razy krótszy niż u kotów (około 6 godzin). Może być to spowodowane szybkim metabolizmem stwierdzanym u kóz. Po podaniu IM, również zaobserwowano najszybszy okres półtrwania eliminacji MAA w porównaniu z wcześniej badanymi gatunkami zwierząt. Jednak wartość okresu półtrwania po podaniu IM była względnie dłuższa niż po podaniu IV. Można to tłumaczyć efektem "flip-flop" wywołanym wolniejszą hydrolizą MET po wstrzyknięciu droga IM.

Ponadto średni czas przebywania leku w organizmie (MRT) był również znacznie dłuższy (ponad 2 razy) po podaniu IM niż IV, przy czym różnica była większa, niż wynikałoby to z różnicy czasu półtrwania pomiędzy obiema drogami podawania.

Stwierdzona wartość AUC MAA, która implikuje ogólnoustrojową ekspozycję na lek, była wyraźnie różna w porównaniu do innych gatunków, chociaż podawana dawka była taka sama, z wyjątkiem owcy (20 mg/kg) np.: wartość AUC kóz ($105,22 \pm 36,54$ h•mg/ml) była porównywalna do tej stwierdzanej u koni ($94,42 \pm 43,60$ h•mg/ml) i osłów ($82,92 \pm 5,46$ h•mg/ml), w przeciwieństwie do zaobserwowanej u psów, różniących się istotnie ($45,34 \pm 9,64$ h•mg/ml) i kotów ($272,62 \pm 143,74$ h•mg/ml). Różnice gatunkowe mogą wynikać z różnic fizykochemicznych w miejscu, w którym zachodzi hydroliza MET (tworzenie MAA opiera się na hydrolizie MET), na którą wpływ mają właśnie czynniki fizykochemiczne, w tym stężenie leku macierzystego, pH czy temperatura.

Ponadto, współczynnik $AUC_{\text{IM/IV}}$ MAA wyniósł ponad jeden ($1,38 \pm 0,42$), co wskazuje na satysfakcjonującą absorpcję leku do krążenia ogólnego po podaniu IM (zakładając, że MET całkowicie przekształcił się w MAA zarówno po podaniu IV jak i IM). We wcześniejszych badaniach z MET na innych gatunkach zwierząt spekulowano, że miejsce wstrzyknięcia domięśniowego może wpływać na wartość AUC ze względu na regionalne różnice w przepływie krwi, oraz że boczna część szyi zapewnia większe wchłanianie ze względu na większy przepływ krwi w porównaniu z okolicą pośladkową. Jednakże, mimo że kozy otrzymywały MET w okolicę pośladka, jak miało to miejsce w badaniach u kotów i psów, w badaniu u kóz uzyskana wartość stosunku $AUC_{\text{IM/IV}}$ była wyraźnie wyższa niż stwierdzana u kotów ($0,63 \pm 0,41$) i psów ($0,75 \pm 0,11$). Jednocześnie wartość ta była podobna do tej uzyskanej we wcześniejszych badaniach na osłach i koniach, którym MET podawano domięśniowo w okolicę szyi.

Średnie stężenie AA było ewidentnie niższe niż MAA zarówno po podaniu IV jak i IM. AA w przypadku obu dróg podania było wykrywalne aż do 24 h, chociaż w ostatnim punkcie czasowym było prawie na poziomie LOQ. Metabolit AA pojawił się szybko i osiągnął C_{max} odpowiednio dla IV i IM po $0,51 \pm 0,36$ i $2,16 \pm 0,93$ h.

Droga IM wykazała dłuższy okres półtrwania AA w fazie eliminacji niż drogą IV. Stosunek $AUC_{IM/IV}$ AA wynosił $2,16 \pm 0,19$ i był około 2 razy większy niż w przypadku MAA, który był również większy niż w przypadku innych wcześniej badanych gatunków zwierząt.

Średnia wartość MRT, która ma istotny wpływ na czas trwania działania leku, była około 3 razy dłuższa niż w przypadku MAA zarówno po podaniu IV jak i IM. U ludzi, metabolity MAA i AA są odpowiedzialne za większość efektów przeciwbólowych ale z różnymi ED_{50} oraz mocą przeciwzapalną. Chociaż dokładny udział metabolitów w działaniu przeciwbólowym u kóz jest nieznany, można oczekiwać, że dobre wchłanianie MET po podaniu IM może prowadzić do względnie dłuższego działania przeciwbólowego w porównaniu z drogą dożylną. Podobne wnioski przedstawiono we wcześniejszych badaniach MET u kotów.

Maksymalne stężenia MAA i AA w mleku po domięśniowym podaniu MET wynosiły odpowiednio $2,14 \pm 0,29$ i $0,22 \pm 0,09$ $\mu\text{g/ml}$. Chociaż stężenia obu metabolitów MET w mleku stopniowo ulegały zmniejszeniu w sposób zależny od czasu, odpowiednio MAA i AA w ilości $1,47 \pm 0,04$ oraz $0,06 \pm 0,00$ $\mu\text{g/ml}$, to nadal występowały 48 h po wstrzyknięciu leku. Ponieważ nie ustalona jest maksymalna granica pozostałości (MRL) dla MAA w mleku kóz, za granicę tą należy uznać wartość LOQ metody.

Podsumowując, kozy z powodzeniem przekształcają MET w aktywne metabolity zarówno po podaniu dożylnym IV, jak i IM. Jednakże, okres półtrwania i stosunek $AUC_{IM/IV}$ metabolitu MAA były względnie krótsze i większe, niż te zgłaszane u innych gatunków zwierząt. Wartości MRT dla MAA i AA były około dwa razy dłuższe dla podania IM w porównaniu do drogi IV. Ponadto, w 48h po podaniu domięśniowym metabolity MET nadal były wykrywalne w mleku.

Wyniki tego badania opublikowano w czasopiśmie z listy JCR:

5.2.5. Kim T. W., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Sitovs A., Poapolathep A., Owen H., Lisowski A., Abilova Z., Giorgi M. (2018) Pharmacokinetic profiles of metamizole (dipyrone) active metabolites in goats and its residues in milk. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, DOI: 10.1111/jvp.12679 (MNiSW2016 = 25; IF2017 = 1,441)

A także przedstawiono na międzynarodowej konferencji w postaci posteru:

- Sitovs A., Kim T.W., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Poapolathep A., Owen H., Lisowski A., Abilova Z., Giorgi M. The fate of the metamizole active metabolites in goats and its residues in milk. *14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. "One Health – Challenges and Innovations"*, Wrocław 24-28.06.2018. P.11.7 (J. Vet. Pharmacol. Ther. 2018 Vol. 41 Suppl. 1 s. 135)

Pozostałe badania w zakresie farmakokinetyki

W ciągu ostatniego roku brałam udział w międzynarodowych badaniach profilu farmakokinetycznego dwóch leków przeciwbakteryjnych u kóz. Obecnie trwają prace nad przygotowaniem publikacji do czasopism z listy JCR. Część wyników badań zostało już zaprezentowane na międzynarodowej konferencji.

- Sitovs A., Vercelli C., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Giorgi M. Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous and subcutaneous administration in domestic goats (*Capra hircus*): a pilot study. *2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets Rīga, Latvia, 19–20.10.2017*, Intrinsic Acticity, 5 (suppl 2), 2017. A2.27.

W nawiązaniu do dalszego poszukiwania substancji o działaniu przeciwbólowym brałam również udział w badaniach profilu farmakokinetycznego Bedrocan (w postaci oleju z ekstraktem marihuany) u psów przegłodzonych i nakarmionych. Obecnie trwają prace nad przygotowaniem publikacji do czasopism z listy JCR. Część wyników badań zostało już zaprezentowane na międzynarodowej konferencji.

- Giorgi M., Stefanelli F., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lisowski A., Poapolathep A., Owen H., Indaimo M.C., Chericoni S. Pharmacokinetics of Bedrocan (marijuana extract oil) in fasted and fed dogs: a pilot study. *14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. "One Health – Challenges and Innovations"*, Wrocław 24-28.06.2018. (J. Vet. Pharmacol. Ther. 2018 Vol. 41 Suppl. 1 s. 38)

5.3. Publikacje przeglądowe

Cześć prac, zróżnicowanych pod względem tematycznym jest efektem badań w ramach działalności statutowej oraz moich szeroko pojętych zainteresowań. Należy tu jedna publikacja w czasopiśmie z listy JCR:

- 5.3.1. Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. (2007) Immunotoxic properties of the pesticides. *Polish Journal of Environmental Studies* 16:213-216. (MNiSW2007 = 10)

A także publikacje w innych recenzowanych czasopismach:

- 5.3.2. Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. (2006) Probiotyki – potencjalna alternatywa dla terapii antybiotykowej. *Magazyn Weterynaryjny Suplement – Świnie*:62-66.
- 5.3.3. Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.** (2006) Chemioterapia zakażeń bakteryjnych układu moczowego u psów i kotów. *Magazyn Weterynaryjny* 14:64-69.
- 5.3.4. Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. (2006) Problemy zwalczania infekcji bakteryjnych u ryb hodowlanych. *Komunikaty Rybackie* 6:11-16.
- 5.3.5. Kowalski C., **Lebkowska-Wieruszewska B.** (2007) „Wlewy dożylnie - ich funkcje i zastosowanie u dużych i małych zwierząt cz.I”. *Magazyn Weterynaryjny* 16:58-59.
- 5.3.6. Kowalski C., **Lebkowska-Wieruszewska B.** (2007) „Wlewy dożylnie - ich funkcje i zastosowanie u dużych i małych zwierząt cz.II”. *Magazyn Weterynaryjny* 16:48-50.
- 5.3.7. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C. (2009) Farmakoterapia przewlekłej niewydolności nerek u psów i kotów - problem stale aktualny. *Magazyn Weterynaryjny* 18:940-944.
- 5.3.8. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C., Lasiecka K. (2012) Preferencje w wyborze niesteroidowych leków przeciwzapalnych u psów i kotów. *Magazyn weterynaryjny* 21:788-792. (MNiSW2012 = 3)

- 5.3.9. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Stopka-Studencki J. (2013) Rola niesteroidowych leków przeciwzapalnych w leczeniu nowotworów u psów i kotów. *Magazyn weterynaryjny* 22:788-792. (MNiSW2013 = 3)
- 5.3.10. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Kim T.W., Owen H., Yun H., Giorgi M. (2016) Czy obecność pokarmu oraz sposobu dawkowania mogą wpływać na skuteczność cymikoksybu u psów? *Magazyn Weterynaryjny* 25:54-59. (MNiSW2016 = 2)
- 5.3.11. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J., Piecyk I., Lisowski A. (2017) Leki przeciwbólowe u kotów, skąd takie różnice w metabolizmie? *Magazyn weterynaryjny* 10:12-16. (MNiSW2016 = 2)

Tematy moich zainteresowań przedstawiałam również na konferencjach krajowych i międzynarodowych:

- Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. Probiotics – an alternative for antibiotics. *The fifth Multidisciplinary Conference on Drug Research. 15-17.05.2006, Darłówko Wschodnie*, str. 58.
- Kowalski C, **Lebkowska B.**, Pomorska M. Wlewy i iniekcje dożylnie cz. I i II. *VII Konferencja Lekarzy Weterynarii. 30.09.2006, Serock*, str. 13-34.
- Kowalski C., Pomorska M., Kowalska M., **Lebkowska B.** Niekorzystny wpływ antybiotyków stosowanych w weterynarii na środowisko oraz ich oznaczanie w matrycach biologicznych. *II Międzynarodowe Sympozjum Naukowe „Środowiskowe źródła zagrożeń zdrowotnych” 26-28.04.2007, Kazimierz Dolny*, str. 546.
- Kowalski C., **Lebkowska B.**, Burmańczuk A. Wykorzystanie naturalnych zeolitów w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska, *II Międzynarodowe Sympozjum Naukowe-Środowiskowe Źródła Zagrożeń Zdrowotnych, 26-28.04.2007, Kazimierz Dolny*, str. 547.
- Kowalski C., **Lebkowska B.**, Pomorska M. Immunotoksyczność pestycydów, *IV Międzynarodowa Onkologiczna Konferencja Naukowa- „Promocja zdrowia, profilaktyka i znaczenie czynników środowiskowych w chorobach nowotworowych”, 31.05.-01.06.2007 Sanok*, str. 65.
- Burmańczuk A., Kowalski C.J., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Zań R. Farmakokinetyka wybranych cefalosporyn u krów mlecznych z przypadkami mastitis. *VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Pt. „Wybrane problemy profilaktyki, diagnostyki i terapii chorób zapalnych, infekcyjnych i nowotworowych”, 20-22.05.2010, Jurata*, str. 20.
- Lasiecka K., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. Stosowanie antyoksydantów w terapii chorób wątroby. *Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Nowe kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej”, 08-11.12.2011, Kościelisko k. Zakopanego*, str. 19.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. Wpływ diklofenaku na wybrane parametry biochemiczne funkcji wątroby i nerek po podaniu per os i per rectum u psów. *Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Nowe kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej”, 08-11.12.2011, Kościelisko k. Zakopanego*, str. 20, [Wykład W3](#).
- Opielak S., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. Mykotoksyny – charakterystyka i zagrożenia. *Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Nowe kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej”, 08-11.12.2011, Kościelisko k. Zakopanego*, str. 22.

- Prokopiuk D., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. Uregulowania prawne dotyczące ochratoksyny A w żywności. *Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Nowe kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej”, 08-11.12.2011, Kościelisko k. Zakopanego*, str. 24.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J.: „Wpływ ochratoksyny A oraz aflatoksyny B2 na parametry biochemiczne kurcząt broilerów”. *XIV Kongres PTNW „Nauka Praktyce”, 13-14.09.2012, Wrocław*, str. 419.
- Lasiicka K., Kowalski C.J., **Lebkowska-Wieruszewska B.** Wpływ przeciwutleniaczy w chorobach stresu oksydacyjnego – przegląd danych. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”, 11-14.12.2012, Krynica Zdrój*, str. 21. Wykład W3.
- Maciołek A., Stefaniak E., **Lebkowska-Wieruszewska B.** Rola niesteroidowych leków przeciwzapalnych w terapii przeciwnowotworowej. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”. 11-14.12.2012, Krynica Zdrój*, str. 28.
- Stefaniak E., Maciołek A., **Lebkowska-Wieruszewska B.** Zastosowanie nutraceutyków w osteoarthritis u psów. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”. 11-14.12.2012, Krynica Zdrój*, str. 39.
- Lasiicka K., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. Kokcydiostatyki w paszach dla drobiu - uwarunkowania prawne na 2013 rok. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”, 11-14.12.2012, Krynica Zdrój*, str. 23.
- Kowalski C.J., **Lebkowska-Wieruszewska B.** „Koksyby” – preferencje wyboru u psów i kotów. *II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”, 11-14.12.2012, Krynica Zdrój*, str. 18.
- Burmańczuk A, Kowalski C.J., Polska B., Zań R., **Lebkowska-Wieruszewska B.** Researches on pharmacokinetics of β -lactam antibiotic after intramammary application (first part –cloxacillin) *2nd International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (ICOPHAI): “One Health for Sustainable Development”, 14–17.08.2013, Porto di Galinhas, Brazylia*, str. 77.
- Kowalski C.J., Burmańczuk A, Zań R., Osypiuk M., Polska B., **Lebkowska-Wieruszewska B.** Method validation for the determination of cloxacillin residues in cow's milk after intramammary infusion. *2nd International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (ICOPHAI): “One Health for Sustainable Development”, 14–17.08.2013, Porto di Galinhas, Brazylia*, str. 22.
- **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Lasiicka K., Opielak S., Kowalski C.J. Wpływ intoksykacji wybranych mykotoksyn na parametry funkcji nerek, wątroby i reakcje wolnorodnikowe, *III Konferencja Naukowa pt.: „Postępy w medycynie i farmakoterapii”, 10-13.12.2013, Karpacz*, str. 47.
- Kowalski C., Burmańczuk A., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Zań R. Pozostałości cefoperazonu w mleku po podaniu dowymieniowym u krów mlecznych- analiza prospektywna i retrospektywna. *XII Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, "Różne oblicza toksykologii", 19-22.09.2017, Puławy, P II-60 C.*

- Lasiecka K.N., Gołębiowska J., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Osypiuk M., Polska B., Kowalski C.J. Impact assessment of aflatoxin B1 acute doses on free radical reactions in the chickens liver. *XV Kongres PTNW, 22–24.09.2016, Lublin*, str.167.
- Kim T.W., Lebkowska-Wieruszewska B., Owen H., Poapolathep A., Tabari M., Chea B., De Vito V., Giorgi M. Comparative pharmacokinetic study of the metamizole (dipyrone) metabolites in companion animals. *14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. "One Health – Challenges and Innovations"*, Wrocław 24-28.06.2018. (*J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2018 Vol. 41 Suppl. 1 s. 135-136)

5.4. Monografie

Wykorzystując swoją wiedzę z zakresu farmakologii weterynaryjnej uczestniczyłam w powstaniu rozdziałów monografii:

- 5.4.1. Kowalski C., Pomorska M., **Lebkowska B.** (2006) Immunotoksyczne właściwości pestycydów. Praca zbiorowa pod redakcją: Ewy Skopińskiej-Różewskiej i Andrzeja K. Siwickiego - Naturalne i syntetyczne modulatory odpowiedzi immunologicznej i angiogenezy. Wydawnictwo: Edycja s.c., Olsztyn, str. 211-228 (ISBN 978-83-88545-02-3)
- 5.4.2. Kowalski C., **Lebkowska B.**, Burmańczuk A., Pomorska M. (2007) Odczyny alergiczne po stosowaniu wybranych antybiotyków. Praca zbiorowa pod redakcją: Andrzeja K. Siwickiego i Ewy Skopińskiej-Różewskiej - Aktualne problemy immunodiagnostyki i immunotoksykologii. Wydawnictwo: Edycja s.c., Olsztyn, str. 109-126 (ISBN 978-83-88545-17-7)
- 5.4.3. Burmańczuk A., **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Klimont E., Polska B., Osypiuk M. (2009) Kontrola pozostałości ampicyliny i kloksacyliny po podaniu dowymieniowym. Praca zbiorowa pod redakcją: Ewy Skopińskiej-Różewskiej i Andrzeja K. Siwickiego – Współczesne Zagrożenia Zdrowotne. Wydawnictwo: Edycja s.c., Olsztyn, str. 407-416 (ISBN 978-83-88545-39-9)
- 5.4.4. Kowalski C., **Lebkowska-Wieruszewska B.** (2010) Chinolony w antybiotykoterapii chorób zakaźnych układu oddechowego bydła. Monografia pod redakcją ogólnopolskiego kwartalnika dla lekarzy weterynarii- Lecznica dużych zwierząt nr. 2, (5) Puławy, str. 31-36, (ISBN 978-83-930662-0-9)
- 5.4.5. Kowalski C.J., **Lebkowska-Wieruszewska B.** (2012) Alternatywy terapii antybiotykowych. Monografia pod redakcją prof. dr hab. Wojciecha Cybulskiego - Farmacja weterynaryjna w Polsce - racjonalne stosowanie antybiotyków – nauka i praktyka, aparatpress s.c., Puławy, str. 48-61 (ISBN 978-83-930662-6-1)
- 5.4.6. Kowalski C.J., **Lebkowska-Wieruszewska B.** (2013) Zdrowie konsumenta wobec standardów antybiotykoterapii weterynaryjnej. Monografia pod red. K. Niemczuka i D. Krasuckiej. Racjonalne stosowanie antybiotyków w weterynarii, PIWet-BPIB, Puławy, str. 171-185 (ISBN 978-83-89946-61-4)
- 5.4.7. **Lebkowska-Wieruszewska B.**, Kowalski C.J. (2016) Zagrożenie konsumentów obecnością pozostałości chemioterapeutyków i antybiotyków w tkankach na przykładzie drobiu. W Monografii: Innowacje w medycynie i farmakoterapii. PFO Vetos-Farma Sp. z o.o., Bielawa str.93-104, (ISBN 978-83-915929-1)

6. Udział w projektach badawczych

Już w trakcie studiów doktoranckich w Zakładzie Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie realizowałam projekty badawcze prowadzone w ramach działalności statutowej.

Ponadto byłam kierownikiem kilku Projektów badawczych w ramach programu konkursowego na finansowanie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie:

- „Zmienność kinetyki NLPZ w zależności od formy farmaceutycznej i drogi podania u wybranych gatunków zwierząt: diklofenak (WKD/MN/2/2011), nabumeton (WKD/MN/2/2012), cymikoksyb (WKD/MN/2/2014)
- „Wpływ intoksykacji wybranych mykotoksyn na parametry funkcji nerek, wątroby i reakcje wolnorodnikowe oraz ocena protekcyjnego działania wybranych antyoksydantów u kurcząt rzeźnych” (WKD/MN/2/2013)

7. Działalność dydaktyczna

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich (2005), po odbyciu 6-cio miesięcznego kursu pedagogicznego, biorę czynny udział w przygotowywaniu i prowadzeniu ćwiczeń, w tym ćwiczeń laboratoryjnych kierunku weterynaria, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (farmakologia weterynaryjna, farmacja weterynaryjna, farmakologia kliniczna) Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Brałam udział w przygotowaniu materiałów szkoleniowych dla lekarzy weterynarii na Konferencji „Ochrona zdrowia ryb - problemy aktualne” pt. Problemy antybiotykoterapii u ryb hodowlanych (28-29.02.2008, Brzesko, str. 3-17).

Od 2010 roku jestem odpowiedzialna za przedmiot „Farmakologia kliniczna” na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. A w 2013 roku otrzymałam Nagrodę indywidualną II° za osiągnięcia dydaktyczne, przyznaną przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, za opracowanie skryptu dla studentów medycyny weterynaryjnej pt.: „Farmakologia kliniczna”.

W 2013 roku odbyłam zagraniczny staż dydaktyczny (STA) w ramach programu LLP Erasmus (Uniwersytet w Pizie, Włochy), który umożliwił mi poznanie standardów dydaktycznych utrzymywanych w jednej z najlepszych jednostek dydaktycznych w Europie.

Od 2018 roku jestem odpowiedzialna za przedmiot „Substancje i surowce pochodzenia roślinnego w profilaktyce i terapii zwierząt” na Kierunku Behawiorystyka Zwierząt, Wydziału Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

W lutym 2018, na zaproszenie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Sassari we Włoszech, byłam członkiem międzynarodowej komisji egzaminacyjnej (obrona 3 prac doktorskich).

Jestem promotorem 4 prac inżynierskich, 3 magisterskich, a także promotorem pomocniczym 1 pracy doktorskiej.

8. Działalność organizacyjna

W trakcie mojej pracy zawodowej brałam czynny udział w działalności organizacyjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

- Od roku 2008 do chwili obecnej jestem członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (kadencja na lata 2008-2012, 2012-2016 oraz 2016-2020).
- Od roku 2008 decyzją Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej zostałam członkiem Wydziałowej Komisji Wyborczej (kadencja na lata 2008-2012, 2012-2016 i 2016-2020).

Byłam czterokrotnie członkiem komitetu organizacyjnego cyklu następujących konferencji:

- Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Nowe kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej”, 08-11.12.2011, Kościelisko k. Zakopanego (sekretarz)
- II Konferencja Naukowa „Farmakologiczne i środowiskowe aspekty racjonalnej terapii”, 11-14.12.2012, Krynica Zdrój (sekretarz)
- III Konferencja Naukowa „Postępy w medycynie i farmakoterapii”, 10-13.12.2013, Karpacz (sekretarz)
- IV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Innowacje w medycynie i farmakoterapii”, 8-11.03.2016, Zakopane (sekretarz)

9. Nagrody i wyróżnienia

Jestem laureatem (3 miejsce) stypendium naukowego dla doktorantów, wspieranego przez Urząd Marszałkowski i Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki - Regionalne Strategie Innowacji 8.2.2. w latach 2008/2009, za pracę doktorską: Różnice w wartościach stężeń sulfachloropirazyliny w tkankach kurcząt i indyków, oznaczonych techniką HPLC w aspekcie wyznaczenia okresu karencji.

Ponadto jestem laureatem 3 nagród za osiągnięcia naukowe oraz jednej za osiągnięcia dydaktyczne przyznanych przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie:

- Nagroda Zespołowa III° za osiągnięcia naukowe, przyznana przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2010r;
- Nagroda Zespołowa II° za osiągnięcia naukowe, przyznana przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2011r.
- Nagroda indywidualna II° za osiągnięcia dydaktyczne, przyznana przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2013r.
- Nagroda indywidualna II° za osiągnięcia naukowe, przyznana przez Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 2016r.

10. Szkolenia i staże

W celu pogłębienia wiedzy z zakresu farmakologii brałam udział w szkoleniach z zakresu nadzoru nad obrotem hurtowym i stosowaniem produktów leczniczych, zarządzania jakością i audytu w laboratorium oraz zachowania Dobrej Praktyki Laboratoryjnej:

- Polska, Szkolenie: „Wzmocnienie administracji weterynaryjnej” - Nadzór nad obrotem hurtowym produktami leczniczymi – zasady Dobrej Praktyki Dystrybucyjnej, Kraków 2006 (Project Phare PL2003/004-379/04.01.03) (5 dni)
- Polska, Szkolenie: „Rola najwyższego kierownictwa w laboratorium”- BTS MARS, Rozwiązania Szkoleniowe, Lublin, 2012 (3 dni)

- Polska, Szkolenie: „Dobra Praktyka Laboratoryjna: podstawy prawne, wymagania, wdrożenie systemu zarządzania jakością w jednostce badawczej”- BTS MARS, Rozwiązania Szkoleniowe, Lublin, 2012 (3 dni)
- Polska, Szkolenie dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych i edukacyjnych zorganizowane na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zgodnie z § 2 rozp. MNiSW z dn. 5 maja 2015 (Dz. U. 2015 poz. 628), Lublin, 10-12.2016 (10 dni)

W związku z szeroką współpracą zagraniczną na polu naukowym odbyłam 4 staże szkoleniowe oraz jeden staż dydaktyczny w ramach programu LLP Erasmus w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie:

- Włochy, tygodniowy wyjazd dydaktyczny STA Erasmus, 11-18.05.2013r.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy STT Erasmus, 10-17.05.2014r.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy STT Erasmus, 15-22.05.2016r.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy STT Erasmus, 23-30.09.2017r.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy STT Erasmus, 17-24.02.2018r.

Ponadto w trakcie studiów doktoranckich odbyłam tygodniowy staż naukowo-dydaktyczny, na zasadzie współpracy międzyuniwersyteckiej (Uniwersytet Przyrodniczy - Uniwersytet w Pizie), w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie, 22-29.11.2007r.

11. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych

Jestem konsultantem merytorycznym czasopism z listy JCR.

- Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2018 (MNiSW2016=25, IF2017=1,441)
- Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2018 (MNiSW2016=40, IF2017=2,064)

12. Inne

Od lat stale współpracuję też z licznymi firmami przemysłu biomedycznego i weterynaryjnego pełniąc funkcję doradczą. Wielokrotnie byłam autorem dokumentacji oraz raportów eksperta zarówno w procesie rejestracji leków jak i w procesie harmonizacji czyli dostosowania dokumentacji produktów leczniczych do przepisów obowiązujących w Unii Europejskiej.

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych oraz szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej jak również innej działalności (wg Dz. U. Nr 196, poz. 1165) zebrałam i przedstawiłam w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Lublin, dn. 18 lipca 2018r.

Beata
Lebkowska-Wieruszewska