

BADANIA NAD SPORZĄDZENIEM PREPARATU  
ZAWIERAJĄCEGO TRIMETOPRIM, SULFADIMETOKSYNĘ,  
TYLOZYNĘ I PREDNIZOLON  
DO LECZENIA SCHORZEŃ GRUCZOŁU MLEKOWEGO KRÓW \*

Zdzisław Synowiedzki, Paweł Połujański, Krystyna Jankowska

Zakład Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych  
Instytut Weterynarii w Warszawie

Kontynuując badania własne nad sporządzaniem preparatów do leczenia *mastitis* [6-8, 10-13] użyto chemoterapeutyki syntetyczne i naturalne, współdziałające w hamowaniu przemiany materii paciorkowców (*Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*), gronkowców (*Staph. aureus*, *Staph. epiderm.*), *E. coli*, *Micrococcus* sp., jak również działające przeciw *Mycoplasma agalactiae*. Preparaty te powinny wykazać się spotęgowaną skutecznością i siłą przeciwdrobnoustrojowego działania każdej poszczególnej substancji czynnej.

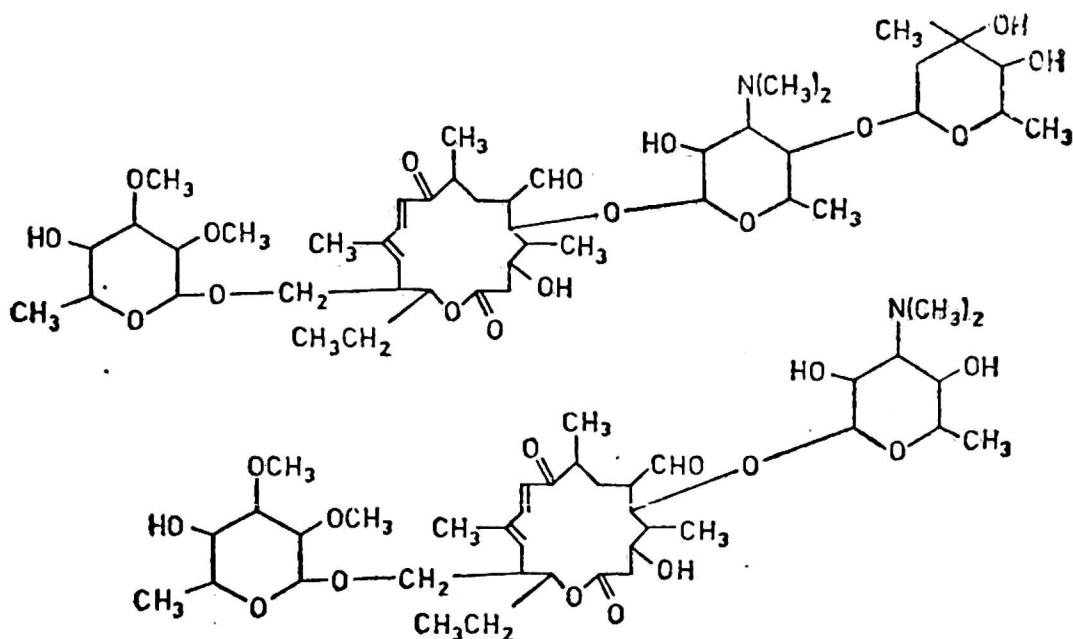
#### MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto: tylozynę, sulfadimetoksynę, trimetoprim i prednizolon. Tylozyna [4], wytwarzana przez szczep *Streptomyces fradiae*, odznacza się szerokim spektrum działania, szczególnie na drobnoustroje Gram-dodatnie i niektóre Gram-ujemne, jak również na *Mycoplasma agalactiae*. W klasyfikacji chemicznej należy ona do grupy makrolidów, posiada bowiem charakterystyczną budowę wielocłonowego pierścienia laktonowego oraz zasadowego aminocukru i cukru zwykłego. Jest słabą zasadą, mało rozpuszczalną w wodzie (5 mg/ml w 25°C). Z wieloma kwasami nieorganicznymi i organicznymi tworzy rozpuszczalne sole fosforowe, wi-

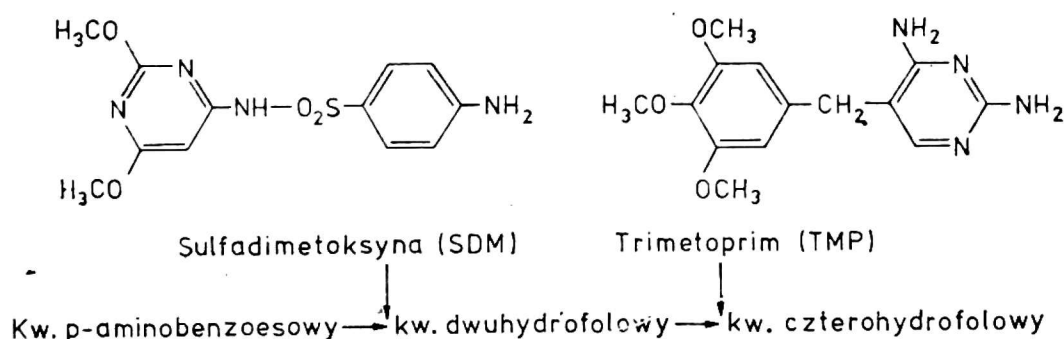
---

\* Badania przeprowadzono z zastosowaniem tylozyny i winianu tylozyny (Tylan soluble), firmy Eli Lilly Corp.-Elanco oraz trimetoprim firmy Wellcome, Anglia.

nowe, glukonowe, mlekowe i inne. Hydrolizuje w słabych kwasach na biologicznie czynną desmykozynę. Wzory strukturalne (tymczasowe) tych związków przedstawiają się następująco:



Sulfadimetoksyna (SDM) i współdziałający z nią trimetoprim (TMP), zgodnie z danymi piśmiennictwa [1-3, 9, 13, 14], powinny blokować odbudowę kwasu dwuhydrofolowego i przeszkadzać w redukcji kwasu dwuhydrofolowego do czterohydrofolowego, a zatem utrudniać biosyntezę wielu drobnoustrojów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, według podanego schematu [5].



Prócz tego, w skład preparatu wchodzi: prednizolon, powodujący zejście procesu zapalnego; podstawa nośna, która służy do zawieszania wymienionych chemoterapeutyków i jednocześnie nie drażni chorych tkanek gruczołu mlekowego.

W wyniku doświadczeń opracowano metody:

1. Sporządzanie preparatu Masticort-Sulfa w postaci zawiesiny, który zawiera poza podstawą nośną 3,8% winianu tylozyny, 10% SDM, 2% TMP i 0,063% prednizolonu;
2. Mikrobiologiczne oznaczanie zawartości tylozyny w preparacie przy użyciu szczepu testowego *Staph. aureus* 9144;

3. Spektrofotometryczne oznaczanie TMP wyizolowanego z preparatu przy pomocy kolumny chromatograficznej, wypełnionej anionitem Dowex 1 × 2, o wielkości suchych ziaren 50/100 mesh, oraz oznaczenie zawartości SDM eluowanego z wymienionego anionitu sposobem miareczkowania 0,1M azotynem sodowym w reakcji dwuazowania;

4. Sporządzenie bibułowych krążków nasyconych 10, 30 i 50  $\gamma$  tylozyny oraz krążków nasyconych 4,2  $\gamma$ /20,8  $\gamma$  TMP/SDM i 1,25  $\gamma$ /23,75  $\gamma$  TMP/SDM do testowania *in vitro* — przy użyciu Wellcome Sensivity Test Agar — wrażliwości drobnoustrojów wyizolowanych z wymienia lub mleka chorych krów, leczonych opracowanym preparatem.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Preparat Masticort-sulfa sporządzono w ten sposób, że do 305 g glikolu polietylenowego 300 dodano 50 g winianu tylozyny rozpuszczonej w 60 ml wody i mieszano mechanicznie do czasu przejścia wytworzonej galaretowatej masy w klarowny roztwór. Ogrzany roztwór do 70°C uzupełniono wysterylizowaną tzw. podstawą nośną, sporządzoną z 700 g glikolu polietylenowego 1600 i 300, 19 g emulgatora ME, 2,65 g estru metylowego kwasu p-oksybenzoesowego i 10 g mocznika [6]. W wytworzonym gęstym, klarownym płynie o temp. 70°C rozpuszczano w kolejności: 1,084 g prednizolonu, 28 g trimetoprim i 140 g sulfadimetoksyny, a następnie po wyłączeniu ogrzewania pozostawiano opalizujący płyn, przy ciągłym kilkugodzinnym mieszaniu do ostygnięcia do 30-35°C. Otrzymano około 1400 g gęstej zawiesiny preparatu, koloru cytrynowożółtego.

W celu chemicznego oznaczenia zawartości TMP i SDM w preparacie izolowano je przy pomocy kolumny chromatograficznej o średnicy 10 mm i wysokości 13 cm, wypełnionej silnie alkalicznym wymiennicem jonowym Dowex 1 × 2 — 50/100 mesh, następująco: 1 g preparatu roztworzono w 7 ml wody; nierozpuszczalne substancje odsączono, suszono, a następnie zadawano je roztworem sporządzonym z 0,5 ml dwumetyloformamidu, 9,25 ml 70-procentowego metanolu i 0,25 ml 1n ługu sodowego, po czym wytrząsano w ciągu kilku minut. Pozostały jeszcze nierozpuszczalny osad powtórnie odsączano i odrzucano, przesącz zaś nanoszono w ciągu 60 min na kolumnę chromatograficzną. W tym czasie z kolumny wycieka TMP, zaś SDM zostaje adsorbowana na wymienniczu jonowym wypełniającym kolumnę. Resztki TMP pozostałe w kolumnie wmywano 200 ml 70-procentowego metanolu i łączono je z wyciekkiem. Zaadsorbowaną SDM na anionicie Dowex 1 × 2 — 50/100 mesh eluowano 200 ml 0,1n HCl w 70-procentowym metanolu. Eluat zagęszczano do 1/3 objętości i zadawano 3 ml 35% HCl, 100 mg KBr, a następnie ochładzano do -5°C.

Oznaczenie zawartości TMP w wycieku z przemywkami wykonano przy pomocy spektrofotometru Zeissa, typ VSU<sup>d</sup> 1, przy  $\lambda = \mu\text{m}$ , w której to TMP wykazuje charakterystyczną absorpcję wobec 70-procentowego metanolu. Wartość absorpcji  $A_0$  dla porównawczego roztworu sporządzonego z TMP firmy Wellcome w 70-procentowym metanolu o stężeniu 20  $\gamma/\text{ml}$  wynosi 0,440 ( $E_1^{1\%} = 220$ ). Procentową zawartość TMP w preparacie oblicza się wg wzoru:

$$X = \frac{A \cdot 2}{A_0},$$

w którym

$A$  — wartość absorpcji próby badanej,

2 — deklarowana procentowa zawartość TMP w Masticort-sulfa.

Oznaczenie zawartości SDM wykonano miareczkując eluat 0,1m  $\text{NaNO}_2$  w reakcji dwuazowania. 1 ml 0,1m  $\text{NaNO}_2$  odpowiada 0,031033 g SDM. Procentową zawartość SDM ( $X$ ) w badanym preparacie oblicza się wg wzoru:

$$X = \frac{a \cdot 0,031033 \cdot 100}{c},$$

w którym

$a$  — zużyta ilość ml 0,1 m  $\text{NaNO}_2$ ,

$c$  — naważka preparatu w g.

Obliczone ilości TMP i SDM były zgodne z deklarowanymi ilościami w preparacie, z tolerancją  $\pm 6\%$ .

Mikrobiologiczne oznaczenie zawartości tylozyny wykonywano po wyizolowaniu jej z preparatu następująco: 615 mg Masticort-sulfa rozpuszczano w 5 ml  $\text{CHCl}_3$  i po kilkunastominutowym wytrząsaniu odsączało roztwór od nierozpuszczonego osadu. Odsączony roztwór zadawano 20 ml  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , ochłodzonego do  $+5^\circ\text{C}$ , w celu wytrącenia tylozyny w postaci syropu. Po zdekantowaniu płynu znad syropu, rozpuszczano go w 2 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  95-procentowego, po czym otrzymany roztwór uzupełniano 20 ml buforu fosforanowego o pH 7,0 i wytrząsano 10 minut. Wytrącony osad usuwano, przesącz zaś, zawierający wyizolowaną tylozynę, uzupełniano wymienionym buforem do 50 ml. Z buforowego roztworu tylozyny sporządzono rozcieńczone roztwory zawierające 2 i 4  $\gamma$  tylozyny w 1 ml (roztwór badany). Oznaczenie tylozyny wykonywano przy użyciu przygotowanych szalek Petriego o  $\phi$  9 cm, zawierających pożywkę (o składzie:

pepton 0,6<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, wyciąg trzustkowy kazeiny 0,4<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, wyciąg drożdżowy 0,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, wyciąg mięsny wołowy 0,15<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, dekstroza 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, agar 1,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> i woda destylowana do 100 ml), zaszczerpioną szczepem testowym *Staphylococcus aureus* 9144 i ustawionych na nich cylinderkach metalowych o  $\phi$  zewnętrznej 8 mm, wewnętrznej 6 mm i wysokości 10 mm. Cylinderki napełniano badanym i porównawczym (standard) roztworem tyłozyny, wstawiano do termostatu o temp. 37°C na 16-18 godzin. Zawartość tyłozyny w preparacie obliczano znanym sposobem ze średnicy stref zahamowania wzrostu szczepu testowego. Mieści się ona przeważnie w granicach deklaracji z tolerancją  $\pm 15^0/0$ .

Ocena skuteczności preparatu Masticort-sulfa była dokonana na Wydziale Weterynarii Akademii Rolniczej w Lublinie przez Tarkiewicza (doniesienie wysłane na V Zjazd PTNW) na 34 krówach (45 ćwiartek). Preparat stosowano dostrzykowo w ciągu 3-6 kolejnych dni w odstępach 12-14 godz, najczęściej na szczycie laktacji w przypadkach zapaleń wymienia rozpoznanych jako *galactophoritis et mastitis catarrhalis acuta* oraz *mastitis acuta gravis* (pałeczki Gram-ujemne gronkowce, paciorkowce). Wyleczono 27 krów, w tym kilka po bezskutecznym leczeniu innymi preparatami.

W Państwowym Zakładzie Lecznicy dla Zwierząt w Łowiczu, J. Niebudek również leczył wymienionym preparatem 17 krów, u których bakteriologicznie stwierdzono ostre stany zapalne wymienia wywołane przez *E. coli*, *Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis* i pałeczki odmienia słabo wrażliwe na penicylinę. Lek wprowadzono dowymienio-wo, po uprzednim zdojeniu mleka, powtarzając zabieg w zależności od procesu chorobowego 2—4-krotnie w odstępach 12-24 godzin. Wyleczono 11 krów. I wreszcie w Państwowym Zakładzie Lecznicy dla Zwierząt w Poniecu i w Państwowym Gospodarstwie Rolnym Dzieczyna, J. Zieliński zastosował preparat u 16 krów w okresie zasuszania. U chorych krów o zmienionym gruczole mlekowym stwierdził w badaniach bakteriologicznych paciorkowiec bezmleczności i gronkowiec złocisty hemolityczny. Preparat podawany w ilości 1 lub 2 tuby (8-16 g) wywierał skuteczny efekt terapeutyczny, bowiem w kontrolnych badaniach mleka pobranego do 5 miesiąca po podaniu Masticort-sulfa nie stwierdzono paciorkowca bezmleczności.

Dalsze badania nad szczegółowym działaniem preparatu w leczeniu *mastitis* są w toku...

## PISMIENICTWO

1. Bushby S. R. M., Hitchings G. H.: Brit. J. Pharmac. Chemother. 33, 72, 1968.
2. Bushby S. R. M.: Postgrad med. J. 45, Suppl. November, 10, 1969.
3. Böhni E.: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 5, 87, 1971.
4. McGuire J. M., Boniece W. S., Higgins C. E., Hoehn M. M., Stark W. M., Westhead J., Wolfe R. N.: Antibiotics and Chemotherapy XI, 320, 1961.
5. Gehring W., Hamza B., Linder H., Marx D., Walser K.: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 6, 105, 1971.
6. Synowiedzki Z., Tarkiewicz S.: Biul. inf. III Zjazdu PTNW, 409, 1966.
7. Synowiedzki Z., Tarkiewicz S.: Urząd Patentowy PRL, Pat. polski 53765, 1967.
8. Synowiedzki Z.: Bull. Vet. Inst. 12, 31, 1968.
9. Schwarz D. E., Ziegler W. H.: Postgrad med. J. 45, Suppl. November, 32, 1969.
10. Synowiedzki Z.: Biul. inf. Zjed. Przem. Zaop. Wet. Zoot. 21, 9, 1969.
11. Synowiedzki Z., Tarkiewicz S.: Zesz. probl. Post. Nauk rol. 95, 319, 1969/1970.
12. Tarkiewicz S., Synowiedzki Z.: Biul. inf. III Zjazdu PTNW, 408, 1966.
13. Tarkiewicz S., Synowiedzki Z.: Zesz. probl. Post. Nauk rol. 95, 327, 1969/1970.
14. Waterworth Pamela M.: Postgrad med. J. 45, Suppl. November, 21, 1969.

З. Сыноведзки, П. Полуяньски, К. Янковска

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРОИЗВОДСТВУ ПРЕПАРАТА СОДЕРЖАЩЕГО  
ТРИМЕТОПРИМ, СУЛЬФАДИМЕТОКСИН, ТИЛОЗИН И ПРЕДНИСОЛОН  
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОРОВ

Резюме

На основании опытов был разработан метод производства препарата для внутривыменного применения у коров. Активными веществами препарата были тартрат тилозина, триметоприм, сульфадиметоксин и преднисолон с совместным широким спектром действия на микроорганизмы, м.пр. на *Mycoplasma agalactiae*, выступающую в заболеваниях вымени коров. Примененные природные и синтетические хемотерапевтики, взаимодействующие в препарате, затрудняют биосинтез многих микроорганизмов вызывающих воспаления, а также повышают эффективность их бактериостатического действия.

Разработанные бумажные кружки насыщенные активными веществами содержащимися в препарате, т.е. тилозином, триметопримом и сульфадиметоксином, были пригодными для тестования *in vitro* восприимчивости микроорганизмов изолированных из молока больного вымени коров леченых препаратом названным предварительно Мастикорт-Сульфа.

На основании экспериментальных данных можно заключать, что препарат отличается ингибиторным действием по отношению к грамположительным и некоторым грамотрицательным микроорганизмам.

Препарат Мастикорт-Сульфа оказался терапевтически эффективным в сухостойный период коров, а также в период лактации у клинически леченых коров в случаях воспаления молочной железы у коров, у которых были обнаружены м.пр. стрептококк безмолочности и гемолитический стафилококк.

Z. Synowiedzki, P. Połujański, K. Jankowska

INVESTIGATIONS ON PRODUCING THE PREPARATION CONTAINING  
TRIMETOPRIM, SULPHADIMETOXIN, TYLOSINE AND PREDNISOLON  
FOR TREATMENT OF MAMMARY GLAND DISEASES IN COWS

S u m m a r y

On the basis of experiments a method of production and control of the preparation for intramammary administration in cows has been developed. Active substances of this preparation were tartrat of tylosine, trimetoprim, sulphadimetoxin and prednisolon, having jointly a wide spectre of action on microorganisms, among others on *Mycoplasma agalactiae*, occurring in cow mammary gland diseases. Natural and synthetic chemotherapeutics applied, interacting in the preparation, make difficult biosynthesis of many inflammation-provoking microorganisms, as well as enhance the effectivity of their bacteriostatic effect.

The developed paper discs saturated with active substances contained in the preparation, i.e. tylosine, trimetoprim and sulphadimetoxin, were useful for testing *in vitro* susceptibility of microorganisms isolated from milk of the sick udder quarter of cows treated at use of the preparation named preliminarily Masticort-Sulfa.

The results of experiments allow to draw the conclusion, that the preparation in question would exert an inhibiting effect in relation to the gram-positive and some gram-negative microorganisms. Masticort-Sulfa proved to be an effective therapeutic preparation when applied in the dry period as well as in the lactation period in clinically treated cows in cases of the mammary gland inflammation in cows, which showed, among others, the presence of lactationlesness streptococcus and of hemolytical staphylococcus.