

Oceniając powojenny okres rozwoju nauk fizjologicznych stwierdzić można, że wzrasta ranga prac badawczych w tej dziedzinie, a naukowcy polscy publikują prace w poważnych czasopismach zagranicznych i biorą udział w krajowych i międzynarodowych kon-

gresach. W 1990 r. w Krakowie odbył się Kongres Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, na którym 2 sympozja zostały poświęcone fizjologii zwierząt gospodarskich.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Ewy, ul. Grabowskiego 5/3, 31-126 Kraków

KRZYSZTOF JANUS, STANISŁAW BARANOW-BARANOWSKI,  
DOROTA JAKUBOWSKA, DOROTA JANKOWIAK, WIESŁAW F. SKRZYPCZAK

## Próba oceny biotransformacyjnej aktywności wątroby u cieląt przy pomocy uproszczonego testu antypirynowego

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,  
ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

### Summary

**Trials to evaluate biotransformative activity of the liver in calves using a simplified antipyrine test**

In the experiment done on 50 calves red and white, aged 10–12 days, were determined pharmacokinetic parameters of antipyrine basing on changes of the concentration of the drug in blood after 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h (a full variant), and in simplified variants, i.e. after 4, 8 and 12 h, (variant B), 4, 8 and 24 (variant C), 4 and 24 h (variant D) and 8 and 24 h (variant E) after intravenous injection of antipyrine at a dose of 15 mg/kg of body weight. It was found that it is possible to evaluate precisely a biotransformative activity of the liver (activity of the system of microsomal monooxygenases (MMO) conjugated with cytochrome P-450 in calves when a simplified variant of the antipyrine test is used in which only 2 or 3 samples of blood are examined and the concentration of fenazone is determined. The pharmacokinetic parameters for antipyrine (in simplified variants) were correlated significantly ( $r = 0.950$ ) with data obtained in a full test. The highest correlation ( $r = 0.990$ ) was noted when blood samples were examined after 4, 8 and 24 h since antipyrine injection.

Antypiryna (fenazon) jest modelową substancją farmakologiczną, służącą do oceny metabolicznej wydolności systemu monoooksygenaz mikrosomalnych (MMO) hepatocytów, sprzężonych z cytochromem P-450 (4, 15, 17, 20). Znaczne wahania aktywności enzymów wchodzących w skład systemu MMO-P-450 w zależności od płci (5), wieku (1, 5), diety (7, 9) i stanu fizjologicznego organizmu (4, 19) wskazują na duże znaczenie oceny wydolności metabolicznej tego układu enzymatycznego w klinice.

Test antypirynowy polega na dożylnym wprowadzeniu określonej ilości fenazonu i oznaczaniu stężenia tej substancji we krwi w określonych przedziałach czasowych (4, 6, 14, 16). Z reguły stosuje się 24-godzinne kolekcjonowanie materiału biologicznego (9, 10, 14, 17, 20). Liczne próby modyfikacji tego testu (doświadczenia przeprowadzane na ludziach) miały na celu ograniczenie ilości pobieranych próbek krwi (w wersji pełnej 8–12) oraz skrócenie okresu ich kolekcjonowania (6, 12, 13, 15, 16). Wykazano, że możliwe jest u ludzi precyzyjne określenie wielkości parametrów farmakokinetyki antypiryny w oparciu o oznaczenie koncentracji tej substancji w 2, a nawet 1 próbce materiału biologicznego (krwi lub śliny) (6, 8, 14, 18).

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie uproszczonego wariantu testu antypirynowego u cieląt, polegającego na zmniejszeniu ilości analizowanych próbek krwi z 8 do 2–3.

### Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na 50 cielętach rasy cb. w wieku 10–12 dni, o średniej masie ciała  $38 \pm 2$  kg. W czasie trwania badań zwierzęta utrzymywane były w kojcach pojedynczych i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami. Przed rozpoczęciem doświadczenia cielęta poddano zabiegowi katetyryzacji żyły jarczowej zewnętrznej. Założenie kateteru umożliwiło dożylną iniekcję antypiryny oraz pobieranie próbek krwi w krótkich odstępach czasu.

Test antypirynowy wykonano u każdego cielęcia dwukrotnie w odstępach 48 godzin (łącznie dokonano 100 oznaczeń parametrów farmakokinetyki fenazonu). Antypirynę podawano w iniekcji dożylniej, w postaci 10% roztworu, w dawce 15 mg/kg masy ciała. W czasie trwania badań cielęta nie otrzymywały żadnych preparatów farmakologicznych mogących wchodzić w interakcję biochemiczną i dystrybucyjną z antypiryną. Próby krwi do analiz, po około 5 ml do probówek z heparyną (250 j.m. Heparinum-Polfa) pobierano przed — 0 oraz po 30 minutach i 1, 2, 4, 6, 8, 12 i 24 godzinach od wstrzyknięcia roztworu testowego. Koncentrację fenazonu w osoczu określano metodą kolorymetryczną (11). Współczynnik eliminacji antypiryny ( $k$ ) i stężenie początkowe ( $C_0$ ) obliczono metodą najmniejszych kwadratów z krzywej stężeń fenazonu w osoczu krwi ( $C$ ) w odniesieniu do czasu ( $t$ ). Pozostałe parametry farmakokinetyki antypiryny obliczono według wzorów:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k}$$

$$V_d = \frac{D}{C_0}$$

$$Cl_A = V_d \cdot k$$

gdzie: D = dawka antypiryny  
 $t_{0,5}$  = okres półtrwania antypiryny  
 $Cl_A$  = klirens metaboliczny antypiryny  
 $V_d$  = objętość dystrybucji antypiryny

Wielkość parametrów farmakokinetyki fenazonu wyliczono określając stężenie tej substancji:

- 1 — we wszystkich pobranych próbkach krwi (30', 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 godziny po iniekcji roztworu testowego) — wariant pełny (A),
- 2 — w próbkach krwi pobranych po upływie 4, 8 i 12 godzin od wstrzyknięcia antypiryny (wariant B),
- 3 — w próbkach krwi pobranych po upływie 4, 8 i 24 godzin od iniekcji antypiryny (wariant C),
- 4 — w próbkach krwi pobranych po upływie 4 i 24 godzin od wstrzyknięcia antypiryny (wariant D),
- 5 — w próbkach krwi pobranych po upływie 8 i 24 godzin od wstrzyknięcia antypiryny (wariant E).

Uzyskane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu za pomocą testu t-Studenta (wyniki testu pełnego porównywano z każdym z wariantów testu uproszczonego). Wyliczono także współczynniki korelacji ( $r$ ) między wynikami wariantu pełnego (A) a wynikami poszczególnych wariantów testu uproszczonego (B, C, D, E).

Tab. 1. Wielkości parametrów farmakokinetyki fenazonu u cieląt, określone na podstawie wyników pełnego i uproszczonego wariantów testu antypirynowego (n = 100)

Oznaczone parametry	Wariant „A” (pełny) (30', 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h)	Wariant „B” (4, 8, 12 h)	Wariant „C” (4, 8, 24 h)	Wariant „D” (4, 24 h)	Wariant „E” (8, 24 h)
$V_d$ (l/kg)	$\bar{x}$ 0,755 s 0,012 r —	0,746 0,017 0,968 *	0,752 0,013 0,939 *	0,740 0,018 0,970 *	0,735 0,019 0,960 *
k (h <sup>-1</sup> )	$\bar{x}$ 0,063 s 0,005 r —	0,065 0,007 0,972 *	0,063 0,006 0,993 *	0,067 0,008 0,963 *	0,069 0,008 0,954 *
$t_{0,5}$ (h)	$\bar{x}$ 11,0 s 1,0 r —	10,6 1,2 0,975 *	11,2 1,0 0,992 *	10,3 1,3 0,962 *	10,0 1,2 0,952 *
$Cl_A$ (ml/min/kg)	$\bar{x}$ 0,79 s 0,07 r —	0,81 0,08 0,970 *	0,79 0,08 0,990 *	0,83 0,09 0,965 *	0,85 0,09 0,955 *

Objaśnienia: \* — istotność współczynnika korelacji przy  $p \leq 0,01$ , liczby w nagłówkach (30', 1, 2, 4, ...) oznaczają czas (h) pobierania prób krwi.

### Wyniki i omówienie

Antypiryna jest powoli metabolizowana u nowo narodzonych cieląt ( $t_{0,5} = 24$  h) (5). Tempo eliminowania fenazonu z osocza tych zwierząt wzrasta istotnie wraz z wiekiem (1), osiągając w 6 miesiącu życia wartości obserwowane u osobników dorosłych ( $t_{0,5} = 3-4$  h) (5). Burrows i wsp. (2) stwierdzili jednak przejściowe wydłużenie okresu półtrwania fenazonu u cieląt pod koniec 3 i w 4 tygodniu życia. Jedynie niewielki procent wprowadzonej do organizmu cieląt antypiryny ulega związaniu z białkami osocza, wielkość frakcji fenazon-białko waha się w granicach od 3 do 10% (3, 10).

Wielkość parametrów farmakokinetyki antypiryny określona na podstawie testu pełnego (wariant A) wynosiła odpowiednio: objętość dystrybucji ( $V_d$ ) = 0,755 l/kg, okres półtrwania ( $t_{0,5} = 11,0$  h), stała eliminacji ( $k$ ) = 0,063 h<sup>-1</sup> oraz klirens metaboliczny ( $Cl_A$ ) = 0,79 ml/min/kg. Średnie wartości tych parametrów oznaczone poszczególnymi wariantami testu uproszczonego (B, C, D, E) zamieszczono w tab. 1; nie różniły się one istotnie (ocena testem — t) od wartości uzyskanych podczas wykonywania testu pełnego (wariant A). Uzyskane wyniki wskazują, że farmakokinetyka fenazonu u cieląt określana na podstawie zmian koncentracji tej substancji farmakologicznej w 8 (test pełny) oraz 2 lub 3 próbkach krwi (warianty uproszczone) jest bardzo zbliżona ( $r > 0,950$ ). Najściślejsze skorelowanie z wynikami testu pełnego ( $r > 0,990$ ) zaobserwowano w przypadku, gdy materiał biologiczny do badań kolekcjonowano po upływie 4, 8, 24 godzin od iniekcji antypiryny (tab. 1). Uzyskane wyniki korespondują z rezultatami doświadczeń innych autorów (6, 12, 14). Mc Pheron i wsp. (12) określając farmakokinetykę fenazonu u ludzi na podstawie oznaczania koncentracji tej substancji w osoczu w 4 i 24 godziny po podaniu antypiryny *per os* stwierdzili, że wielkości okresu półtrwania fenazonu obserwowane w wariacie uproszczonym były bardzo zbliżone do wielkości uzyskanych podczas wykonywania pełnego testu antypirynowego (kolekcjonowano 6 próbek krwi). Farrell i Zaluzny (8) zaobserwowali natomiast ścisłą korelację między wielkościami klirensu metabolicznego antypiryny określanego na podstawie oznaczania zmian tej substancji farmakologicznej w 2 i 6 próbkach osocza. Scavone i wsp. (14) stwierdzili najściślejsze skorelowanie

( $r = 0,93$ ) wielkości parametrów kinetyki antypiryny wyliczonych w oparciu o dane uproszczonego i pełnego testu antypirynowego, jeżeli w wersji uproszczonej próbki krwi do analiz pobierano po upływie 8 i 24 godzin od wprowadzenia fenazonu do organizmu.

Podsumowując można stwierdzić, iż możliwe jest precyzyjne określenie parametrów farmakokinetyki antypiryny u cieląt, a co za tym idzie — biotransformacyjnej czynności wątroby (system MMO-P-450) na podstawie oznaczania stężenia tej substancji jedynie w 2 lub 3 próbkach krwi. Kolekcjonowanie krwi po upływie 4, 8 i 24 godzin od wprowadzenia antypiryny do organizmu pozwala na osiągnięcie wyników najbardziej zbliżonych do obserwowanych podczas wykonywania pełnego testu antypirynowego ( $r > 0,990$ ).

Uproszczony test antypirynowy, oparty o oznaczanie koncentracji fenazonu w 2—3, zamiast jak w wersji pełnej w 8 próbkach osocza, pozwala na precyzyjną ocenę biotransformacyjnej czynności wątroby (aktywności systemu enzymatycznego MMO-P-450) u cieląt.

### Piśmiennictwo

1. Baranow-Baranowski S., Janus K., Jakubowska D.: *Medycyna Wet.* 44, 110, 1988.
2. Burrows G. E., Tyler R. D., Craginill A. L., Barto P. B.: *Am. J. Vet. Res.* 45, 1586, 1984.
3. Clarke C. R., Short C. R., Hsu R. C., Baggot J. B.: *Am. J. Vet. Res.* 46, 2461, 1985.
4. Danhof M., Teunissen M. W.: *Pharm. Int.* 5, 11, 1984.
5. Depelchin B. O., Bloden S., Michaux C., Ansay M.: *Res. Vet. Sci.* 44, 135, 1988.
6. Dossing M., Poulsen H. E., Andreassen P. B., Tygstrup N.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 32, 392, 1982.
7. Engelking L. R., Blyden G. T., Lofstedt J., Greenblatt D. J.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 10, 73, 1987.
8. Farrell G. C., Zaluzny L.: *Br. J. clin. Pharmacol.* 18, 559, 1984.
9. Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D.: *Medycyna Wet.* 45, 228, 1989.
10. Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D.: *Pol. Arch. Wet.* (w druku).
11. Kužel K., Doležal M.: *Cas. Lek. Ces.* 103, 1160, 1964.
12. Mc Pheron G. A. D., Benjamin I. S., Boobis A. R., Brodie M. J., Hampden C., Blumgart L. H.: *Gut.* 23, 734, 1982.
13. Poulsen H. E., Loft S.: *J. Hepatol.* 6, 374, 1988.
14. Scavone J. M., Greenblatt D. J., Blyden G. T., Harmatz J. S., Craziano P. J.: *Br. J. clin. Pharmacol.* 25, 695, 1988.
15. Sivagnanam G., Adithan C., Raveendran R., Shashindran C. H., Bapna J. S.: *Indian J. Med. Res.* 87, 80, 1988.
16. Svensson C. K.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 44, 365, 1988.
17. Uic I.: *Ceskol. Farm.* 33, 440, 1984.
18. Ulicna O., Brixova E., Volmut J.: *Biochem. clin. Bohemosl.* 12, 215, 1983.
19. Vital-Durand D., Piolat C., Soucheleaux J., Baltassat P., Brazier P. L.: *Therapie* 43, 263, 1988.
20. Zawodnik L. B., Lukjenko P. I., Buszma M. I.: *Farmakol. Toksikol.* 52, 95, 1989.

Adres autora: dr Krzysztof Janus, ul. Bohaterów Stalingradu 7/4, 74-100 Gryfino

**KNIP TH. A. M., PIETERSE M. C., VAN BENEDEN TH. H., VOŠ P. L. A. M., WURTH Y. A., TARENE M. A. M.: Nowa metoda otrzymywania zarodków bydłęcych: potencjalna alternatywa dla superowulacji, (A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation).** *Vet. Rec.* 128, 208—210, 1991 (9)

Na 8 krowach o normalnym cyklu płciowym przebadano możliwość transwaginalnego nakłucia pęcherzyków pod kontrolą echosondy w celu pobrania niedojrzałych oocytów do produkcji *in vitro* zarodków. W 6 doświadczeniach przeprowadzonych w odstępie 7 dni otrzymano 104 oocyty. Po dojrzaniu w warunkach *in vitro*, a następnie zapłodnieniu 104 oocyty przeniesiono do jajowodów owiec bioicrów. Po 6 dniach 75 oocytów wypłukano z jajowodów. Spośród nich 24% rozwinęło się w morule lub blastocyty, które nadały się do przeszczepienia. Zastosowana w badaniach nieoperacyjna metoda umożliwiła kilkakrotne pobieranie niedojrzałych oocytów i daje wyniki zbliżone do otrzymywanych przy indukcji superowulacji.