

KRZYSZTOF JANUS, JOLANTA SUSZYCKA, ZBIGNIEW MUSZCZYŃSKI*

Porównanie testu eliminacji antypiryny ze zmianami stężenia endogennych kwasów żółciowych we krwi cieląt*)

Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judyma 26, 71-466 Szczecin
*Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

Janus K., Suszycka J., Muszczyński Z.

Comparison of the antipyrine elimination test in calves with the changes of endogenous bile acids concentration in the blood

Summary

The aim of this study was a comparison of results of the bile acids test and antipyrine test on calves. The experiment was carried out on 10 healthy calves of Black and White breed. In each subject the antipyrine test was performed on day 10 and 20 after birth. The concentration of bile acids in plasma before feeding (fasting – f SKŻ) and 2 hours after feeding (p SKŻ) were also determined. A correlation analysis was used to compare results of the bile acids test with the antipyrine test. The obtained results indicated that the hepatic biotransformation rate of antipyrine in calves increased significantly with age. The concentrations of fasting bile acids in the plasma of 10 day-old calves and 20 day-old calves were not significantly different. Similar results were obtained in the case of postfeeding bile acids concentrations. In contrast, the concentration of bile acids in plasma 2 hours after feeding was significantly ($P < 0.01$) higher (both in 10 day-old and 20 day-old calves) than the concentration of fasting bile acids. It was determined that fasting and postfeeding concentrations of bile acids in plasma and values of metabolic clearance of antipyrine (Cl_A) were significantly ($P < 0.01$) correlated.

Od wielu lat poszukiwany jest uniwersalny test pozwalający z dużą precyzją określić wydolność metaboliczną, a w tym aktywność biotransformacyjną wątroby (8, 13, 19, 20, 22, 28). Najbardziej przydatne do oceny szybkości biotransformacji wątrobowej jest stosowanie testów z użyciem substancji markerowych (5, 22, 25, 29). Testy te umożliwiają zarówno ocenę indukcji, jak również obniżenia aktywności enzymów mikrosomalnych hepatocytów (5, 6, 8, 18, 28). Większość stosowanych obecnie substancji markerowych umożliwia ocenę aktywności enzymów mikrosomalnych biorących udział w procesach oksydacji (20, 22, 26, 27).

Dla określenia aktywności monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 (MFO-P-450) coraz częściej stosuje się próbę polegającą na określeniu parametrów kinetyki antypiryny (3, 5, 13, 25). Obecnie test antypirynowy jest powszechnie uznawanym badaniem umożliwiającym przeprowadzenie w warunkach *in vivo* najpełniejszej oceny wydolności metabolicznej układu MFO-P-450 (1, 3-5, 7, 13, 20).

W licznych badaniach wykazano, iż oznaczanie stężenia kwasów żółciowych we krwi jest czułym testem pozwalającym na określenie stanu czynno-

ściowego wątroby u ludzi (10-12, 14, 17). Stwierdzono, że szczególnie dużą wartość diagnostyczną ma oznaczanie poposiłkowego stężenia kwasów żółciowych (12, 17, 21, 23).

Metabolizm antypiryny i kwasów żółciowych (przynajmniej częściowo) odbywa się w obrębie siateczki śródplazmatycznej gładkiej hepatocytów przy udziale monoooksygenaz mikrosomalnych, zależnych od cytochromu P-450 (9, 12, 13, 21).

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wyników testu z endogennymi kwasami żółciowymi oraz referencyjnego, dla oceny aktywności układu MFO-P-450, testu antypirynowego.

Materiał i metody

Materiał. Doświadczenie przeprowadzono na 10 klinicznie zdrowych cieląt rasy nizinnio czarno-białej w 10 i 20 dniu życia. W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta były utrzymywane w ujednoliconych warunkach środowiskowych i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami. Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta poddano zabiegowi kateteryzacji żyły jarzmowej zewnętrznej. Zabieg ten umożliwił pobieranie próbek krwi w krótkich odstępach czasu. W trakcie trwania badań cielęta nie otrzymywały żadnych preparatów mogących wchodzić w interakcję farmakokinetyczną i biochemiczną z antypiryną.

*) Praca wykonana i finansowana w ramach grantu nr BW/D/Z/55/95

Test antypirynowy. Cielętom podano w 10 i 20 dniu życia 20 mg/kg m.c. antypiryny (Sigma Chem. Co. – St. Louis, USA) w jednorazowej iniekcji dożylniej (jako tzw. bolus), w postaci 10% sterylnego roztworu. Próby krwi do analiz pobierano przed (0) oraz po 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18 i 24 godzinach od podania substancji testowej. Krew pobierano do probówek z heparyną (250 j.m. Heparinum-Polfa), a następnie odwirowywano osocze (4000 g, 15 min.). Do czasu przeprowadzenia analiz próby przechowywano w temperaturze -20°C .

Metody analityczne. Stężenie antypiryny w osoczu krwi oznaczano metodą spektrofotometryczną (2), przy zastosowaniu fotometru Spekol-11 firmy Carl Zeiss Jena i długości fali 350 nm. Błąd metody wynosił $\pm 5\%$.

Stężenie endogennych kwasów żółciowych (KZ) w krwi pobranej na czczo (f SKZ) oraz w 2 godziny po nakarmieniu cieląt (p SKZ) określono metodą enzymatyczną, z użyciem zestawu Sterognost 3 α (Nyegaard, Oslo).

Obliczenia farmakokinetyczne. Farmakokinetykę antypiryny określano według modelu jednokompartmencowego otwartego, przy wykorzystaniu oznaczeń w fazie wolnej (β) eliminacji tej substancji (5, 28, 29). Faza α stanowi jedynie około 8% pola powierzchni pod krzywą (AUC) i dlatego może być pominięta w obliczeniach (5, 15, 22). Współczynnik eliminacji antypiryny (k) oraz stężenie początkowe (C_0) obliczono metodą najmniejszych kwadratów z krzywej stężeń tej substancji w osoczu w odniesieniu do czasu (t). Wielkość klirensu metabolicznego antypiryny (Cl_A) wyliczono zgodnie ze wzorem: $Cl_A = V_d * k$, gdzie V_d – objętość dystrybucji antypiryny obliczona według wzoru: $V_d = D/C_0$; D – dawka antypiryny.

Obliczenia statystyczne. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą testu t-Studenta. Wyliczono także współczynniki korelacji między wielkościami metabolicznego klirensu antypiryny (Cl_A) a stężeniami f SKZ i p SKZ. Do obliczeń wykorzystano program STATGRAPHICS (v. 5.0).

Wyniki i omówienie

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono zwiększenie metabolicznego klirensu antypiryny (Cl_A) wraz z wiekiem badanych cieląt. U zwierząt 10-cio dniowych wielkość Cl_A wynosiła 38,05 ml/min., natomiast u cieląt 20-to dniowych – 43,58 ml/min. Różnica ta okazała się statystycznie istotna na poziomie $P < 0,01$ (tab. 1).

Stężenie kwasów żółciowych przed posiłkiem (f SKZ) w osoczu krwi 10-dniowych i 20-dniowych cieląt nie różniło się istotnie, wynosząc odpowiednio 3,57 $\mu\text{mol/l}$ i 3,46 $\mu\text{mol/l}$ (tab. 2). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku poposiłkowego stężenia endogennych kwasów żółciowych (p SKZ). Wartości p SKZ u 10-dniowych i 20-dniowych cieląt wynosiły odpowiednio 4,71 $\mu\text{mol/l}$ oraz 4,52 $\mu\text{mol/l}$ (tab. 2). Zaobserwowano natomiast statystycznie istotne ($P < 0,01$) różnice między stężeniem kwasów żółciowych przed posiłkiem i po posiłku, zarówno u 10-dniowych, jak i 20-dniowych cieląt. Uzyskane wartości wynosiły odpowiednio:

Tab. 1. Wielkości metabolicznego klirensu antypiryny (Cl_A) u badanych cieląt

Numer cielęcia	Wiek cieląt	
	10 dni Cl_A (ML/MIN)	20 dni Cl_A (ML/MIN)
1	36,25	44,00
2	41,15	44,85
3	38,11	45,11
4	36,00	43,06
5	30,03	42,67
6	43,25	44,14
7	39,50	44,95
8	40,45	41,67
9	36,89	41,88
10	38,88	43,50
\bar{x}	38,05	43,58
$\pm s$	3,63	1,25
istotn. różnic 20 vs 10	$p < 0,01$	

f SKZ₁₀ = 3,75 $\mu\text{mol/l}$, p SKZ₁₀ = 4,71 $\mu\text{mol/l}$; f SKZ₂₀ = 3,46 $\mu\text{mol/l}$, p SKZ₂₀ = 4,52 $\mu\text{mol/l}$ (tab. 2). Wykazano istotną ujemną korelację między wielkościami metabolicznego klirensu antypiryny oraz stężeniem endogennych kwasów żółciowych w osoczu krwi badanych cieląt. Najściślejszą korelację zaobserwowano między f SKZ a Cl_A u 10-dniowych cieląt ($r = -0,996$). Najniższy (choć również statystycznie istotny) współczynnik korelacji stwierdzono w przypadku p SKZ i Cl_A u 20-dniowych cieląt ($r = -0,875$). Wielkości tego współczynnika między p SKZ i Cl_A u 10-dniowych cieląt oraz f SKZ i Cl_A u 20-dniowych cieląt wynosiły odpowiednio -0,951 i -0,961.

Antypiryna jest powoli metabolizowana u nowo narodzonych cieląt ($t_{0,5} = 24$ h) (1, 6, 7, 16). Tempo eliminowania tej substancji testowej z osocza tych zwierząt wzrasta istotnie wraz z wiekiem, osiągając w 6 miesiącu życia wartości obserwowane u osobników dorosłych ($t_{0,5} = 3-4$ h) (7). Burrows i wsp. (4) stwierdzili jednak przejściowe wydłużenie okresu półtrwania antypiryny u cieląt pod koniec 3 i w 4 tygodniu życia. Uzyskane w przeprowadzonym doświadczeniu wyniki (istotne zwiększenie wielkości metabolicznego klirensu antypiryny między 10 a 20 dniem życia cieląt) potwierdzają nasze wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące jej farmakokinetyki w

Tab. 2. Stężenie endogennych kwasów żółciowych w osoczu krwi badanych cieląt ($\mu\text{mol/l}$)

Numer cielęcia	Wiek cieląt			
	10 dni		20 dni	
	na czczo (f SKZ)	po posiłku (p SKZ)	na czczo (f SKZ)	po posiłku (p SKZ)
1	4,17	5,45	3,56	4,65
2	3,08	4,34	3,12	4,15
3	3,67	4,89	3,00	4,00
4	4,17	5,11	3,56	4,78
5	5,33	6,00	3,78	4,45
6	2,78	3,67	3,34	4,35
7	3,42	4,23	3,11	4,25
8	3,23	4,05	3,89	4,98
9	4,11	5,00	3,80	4,88
10	3,56	4,34	3,45	4,75
\bar{x}	3,57	4,71	3,46	4,52
$\pm s$	0,73	0,71	0,31	0,33
istotn. różnic p SKZ vs f SKZ	p < 0,01		p < 0,01	

organizmie tych zwierząt (1, 16) oraz są zgodne z rezultatami badań Depelchina i wsp. (6). Świadczą one także jednoznacznie o tym, iż cielęta 20-dniowe charakteryzują się istotnie szybszą biotransformacją wątrobową, uwarunkowaną większą aktywnością monooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450, w porównaniu ze zwierzętami 10-dniowymi.

Stężenie endogennych kwasów żółciowych we krwi uważane jest za czuły test wydolności wątroby (9, 10, 17, 21). Hofmann (14) pierwszy zwrócił uwagę, że oznaczanie stężenia KŻ po bodźcu pokarmowym (poposiłkowe – p SKZ), stymulującym wyrzut dużej ilości kwasów żółciowych, jest czulszym wskaźnikiem stanu czynnościowego wątroby niż stężenie kwasów żółciowych na czczo (f SKZ). Większość autorów zgadza się z tą opinią (17, 21, 23), ale nie wszyscy (24).

W stanach fizjologicznych większość wchłanianych w jelicie cienkim kwasów żółciowych wychwytywana jest przez hepatocyty już w czasie pierwszego ich przejścia w krążeniu jelitowo-wątrobowym, a tylko niewielka ich ilość omija wątrobę i dostaje się do krążenia ogólnego. Dlatego w warunkach normalnych stężenia kwasów żółciowych we krwi obwodowej są niskie i są wyrazem równowagi między wchłanianiem jelitowym a klirensiem wątrobowym (14, 17).

W sytuacji, gdy w mikrosomach komórki wątrobowej metabolizowana jest antypiryna i w tych samych strukturach komórkowych odbywa się jeden z etapów transportu kwasów żółciowych, można było się spodziewać korelacji między tymi dwoma procesami (21).

Uzyskane w niniejszym eksperymencie wyniki są zbieżne z rezultatami doświadczeń Habiora (9, 10, 11), który wykazał istotną dodatnią korelację między wielkościami okresu półtrwania antypiryny, a stężeniem kwasów żółciowych we krwi u ludzi (zarówno na czczo jak i po posiłku).

Wnioski

1. Ścisła korelacja między wynikami testu eliminacji antypiryny, a zmianami stężenia endogennych kwasów żółciowych (KŻ) we krwi wskazuje na możliwość oceny metabolicznej wydolności wątroby u cieląt na podstawie oznaczania koncentracji KŻ we krwi.

2. Wiek cieląt nie wywiera istotnego wpływu na stężenie endogennych kwasów żółciowych we krwi, zarówno na czczo, jak i po posiłku.

Piśmiennictwo

1. Baranow-Baranowski S., Janus K., Jakubowska D.: *Medycyna Wet.* 44, 110, 1988.
2. Brodie B. B., Axelrod J., Soberman R., Levy B.: *J. Biol. Chem.* 179, 25, 1949.
3. Brunner L. J., Di Piro J. T., Feldman S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 345, 1995.
4. Burrows G. E., Tyler R. D., Craigmill A. L., Barto P. B.: *Am. J. Vet. Res.* 45, 1586, 1984.
5. Denhof M., Teunissen M. W.: *Pharm. Int.* 5, 11, 1984.
6. Depelchin B. O., Bloden S., Ansary M.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 10, 49, 1987.
7. Depelchin B. O., Bloden S., Michaux C., Ansary M.: *Res. Vet. Sci.* 44, 135, 1988.
8. Elsheikh H. A., Ali B. H., Homeida A. M., Hassan T., Hapke H. J.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 14, 269, 1991.
9. Habior A.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 68, 125, 1982.
10. Habior A.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 68, 133, 1982.
11. Habior A.: *Przegl. Lek.* 40, 431, 1983.
12. Habior A., Ostrowski J., Trzeciak L., Wojciechowski K.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 84, 284, 1990.
13. Hartleb M.: *Biopharm. Drug Disp.* 12, 559, 1991.
14. Hofmann A.: *Hepatology*, 2, 512, 1982.
15. Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D., Jankowiak D., Skrzypczak W. F.: *Medycyna Wet.* 47, 330, 1991.
16. Janus K., Jankowiak D., Skrzypczak W. F.: *Probl. Ter. Monit.* 3, 72, 1992.
17. Javitt N.: *Gastroenterol.* 6, 219, 1987.
18. Kalow W.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31, 633, 1987.
19. Kawalek J. C., El Said K. R.: *Am. J. Vet. Res.* 51, 1736, 1990.
20. Konig P. K., Cantilena L.: *Arch. Int. Med.* 154, 590, 1994.
21. Korman M., Hofmann A., Summerskill W.: *N. Engl. J. Med.* 290, 1399, 1984.
22. Loft S.: *Pharmacol. Toxicol.* 66, (supl. 6) 1, 1990.
23. Mędrzejewski W., Habior A., Samociuk-Mędrzejewska B.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 75, 263, 1986.
24. Monroe P., Baker A., Schneider J., Krager P., Klein P., Schoeller D.: *Hepatology*, 2, 317, 1982.
25. Poulsen H. E., Loft S.: *J. Hepatol.* 6, 374, 1988.
26. Van Bezooijen C. F. A., Van Oorschoot R. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 683, 1989.
27. Van Geel C. A. F., Van Bezooijen C. F. A.: *Mech. Ageing Dev.* 53, 169, 1990.
28. Wiela A., Orzechowska-Juzwenko K.: *Post. Hig.* 41, 136, 1987.
29. Wiela A., Orzechowska-Juzwenko K., Kotlarek-Haus S., Plemieniak B.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 26, 562, 1988.

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