



KRZYSZTOF JANUS, JOLANTA SUSZYCKA, ZBIGNIEW MUSZCZYŃSKI\*

## Dobowe zmiany szybkości biotransformacji antypiryny u cieląt<sup>\*)</sup>

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.

### Diurnal changes of antipyrine biotransformation in calves

#### Summary

The aim of this study was to determine the „day-night” changes of the antipyrine biotransformation rate in calves.

The experiment was carried out on 10 bulls-calves of the black and white breed. During the experiment the animals were kept in uniform environmental conditions and constant light/dark cycle – L/D = 12:12. The antipyrine test was performed on days 10, 20 and 40 after birth. Antipyrine was administered intravenously at a dose of 1000 mg in a 10% sterile solution. Pharmacokinetic parameters of antipyrine were calculated from the elimination curve in two time-intervals (9.00-17.00 – „day”; 21.00-5.00 – „night”), by means of the TopFit 2.0 test.

Mean values of half-life and metabolic clearance of antipyrine for all examined calves (n=10) did not differ significantly. Based on results obtained in each calf, the examined population was divided into 2 groups: in 7 calves a decrease of antipyrine half-life and an increase of metabolic clearance during the day were confirmed. The observed changes increased with the age of the examined calves. A different phenomenon was observed in 3 calves – antipyrine elimination from plasma was faster during the night. Also in this case observed changes increased with the age of the calves. The initial concentration of antipyrine and the distribution coefficient did not differ significantly between day and night.

Badania farmakokinetyczne wskazują na istnienie rytmiki okołodobowej metabolizmu wielu środków farmakologicznych (6, 9, 11, 12, 14, 20). Jest ona, między innymi, wynikiem dobowych zmian aktywności monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów (1, 10, 15, 20, 21). Znajomość rytmiki okołodobowej (dobowych zmian) aktywności enzymów uczestniczących w wątrobowym metabolizmie ksenobiotyków ma istotne znaczenie z punktu widzenia farmakologii i toksykologii (6, 10, 20, 23).

Dla określenia aktywności systemu monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 najczęściej stosuje się test polega-

jący na określeniu parametrów kinetyki antypiryny (5, 8, 18, 22). Test antypirynowy jest powszechnie uznawanym badaniem umożliwiającym przeprowadzenie w warunkach *in vivo* najpełniejszej oceny wydolności metabolicznej układu MFO-P-450 (13, 18, 22, 36).

Dobowa zmienność farmakokinetyki antypiryny u ludzi i zwierząt laboratoryjnych była już przedmiotem badań zarówno autorów polskich (11, 19, 32) jak i zagranicznych (2, 30, 33). Rzadko spotyka się natomiast publikacje dotyczące dobowych zmian szybkości metabolizmu tej substancji testowej u zwierząt gospodarskich. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę farmakokinetyki antypiryny, okołodobowych (dzień-noc) różnic w szybkości biotransformacji wątrobowej u cieląt w różnym wieku.

<sup>\*)</sup> Praca wykonana i finansowana w ramach grantu nr BW/D/Z/55/95.

Tab. 1. Wartości średnie ( $\bar{x} \pm s$ ) parametrów farmakokinetycznych antypiryny u badanych cieląt

Wiek cieląt	Dzień - (D) Noc - (N)	T <sub>0,5</sub> (h)	K (h <sup>-1</sup> )	Cl <sub>A</sub> (ml/min/ /kg)	AUC (μg/ml >h)	Istotność różnic
10 dni	D, n=7	12,49 0,51	0,055 0,002	0,68 0,03	614 23	p ≤ 0,01
	N, n=7	14,58 0,50	0,047 0,002	0,57 0,03	725 29	
	D, n=3	14,37	0,048	0,58	716	
	N, n=3	11,50	0,060	0,73	573	
20 dni	D, n=7	11,31 0,47	0,061 0,003	0,66 0,03	508 21	p ≤ 0,01
	N, n=7	14,07 0,37	0,049 0,001	0,53 0,02	630 17	
	D, n=3	12,93	0,053	0,57	581	
	N, n=3	9,97	0,069	0,76	436	
40 dni	D, n=7	10,33 0,36	0,067 0,002	0,66 0,03	360 14	p ≤ 0,01
	N, n=7	13,68 0,38	0,053 0,004	0,53 0,06	456 46	
	D, n=3	12,03	0,057	0,57	417	
	N, n=3	9,03	0,076	0,76	314	

### Material i metody

**Material.** Doświadczenie przeprowadzono na 10 klinicznie zdrowych cieląt-byczkach rasy czarno-białej w 10., 20. i 40. dniu życia. W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta były utrzymywane w ujednoczonych warunkach środowiskowych (L/D = 12:12) i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami.

Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta poddano zabiegowi katetyzacji żyły szyjnej 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.

**Test antypirynowy.** Cielętom podano w 10., 20. i 40. dniu życia 1000 mg antypiryny (Sigma Chem. Co. – St. Louis, USA) w postaci jednorazowej iniekcji dożylną (jako tzw. bolus), w postaci 10% sterylnego roztworu. Próby krwi do analiz pobierano przed (0) oraz po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 i 24 godzinach od podania substancji testowej. Krew pobierano do próbek z heparyną (250 j.m. Heparinum-Jelfa), a następnie odwirowywano osocze (4000 g, 15 min.). Do czasu przeprowadzenia analiz próby przechowywano w temperaturze – 20°C.

Stężenie antypiryny w osoczu krwi oznaczano metodą spektrofotometryczną (4).

**Obliczenia farmakokinetyczne.** Farmakokinetykę antypiryny określało według modelu jednokompartamentowego otwartego, przy wykorzystaniu oznaczeń w fazie wolnej (β) eliminacji tej substancji (8, 13, 22). Faza α stanowi jedynie około 8% pola powierzchni pod krzywą (AUC) i dlatego może być pominięta w obliczeniach (8, 18, 36). Współczynnik eliminacji antypiryny (k) oraz stężenie początkowe (C<sub>0</sub>) obliczono metodą najmniejszych kwadratów z krzywej stężeń tej substancji w osoczu w odniesieniu do czasu (t). Wielkość klirensu metabolicznego antypiryny (Cl<sub>A</sub>) wyliczono zgodnie ze wzorem: Cl<sub>A</sub> = V<sub>d</sub> · k, gdzie V<sub>d</sub> – objętość dystrybucji antypiryny obliczona według wzoru: V<sub>d</sub> = D/C<sub>0</sub>; D – dawka antypiryny.

Wielkości badanych parametrów farmakokinetycznych antypiryny obliczono na podstawie analizy krzywych eliminacji tej substancji testowej (program TopFit 2.0), w dwóch przedziałach czasowych (9.00-17.00 – dzień i 21.00-5.00 – noc).

**Obliczenia statystyczne.** Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą testu t-Studenta. Do obliczeń

wykorzystano program STATGRAPHICS (v. 5.0).

### Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1-3.

Średnie wielkości okresu półtrwania antypiryny dla przedziału czasowego dzień w całej badanej populacji cieląt wynosiły w przypadku cieląt 10-dniowych – 13,05 h, 20-dniowych – 11,80 h, natomiast 40-dniowych – 10,84 h, a wielkości okresu półtrwania antypiryny wynosiły dla przedziału czasowego noc odpowiednio 13,66 h, 12,44 h i 12,09 h (tab. 3). Zaobserwowane różnice nie okazały się statystycznie istotne (tab. 3).

Potwierdzenia statystycznego nie uzyskały również średnie różnice współczynnika dystrybucji (Δ), stałej eliminacji (k), klirensu metabolicznego (Cl<sub>A</sub>) antypiryny oraz wielkości pola powierzchni pod krzywą (AUC) (tab. 3).

Wyniki oznaczeń parametrów farmakokinetycznych antypiryny u poszczególnych cieląt pozwoliły na wyodrębnienie wśród badanych zwierząt dwóch podgrup: u 7 cieląt stwierdzono istotnie krótszy okres półtrwania i większy klirens metaboliczny antypiryny w dzień, przy czym obserwowane ten-

dencje ulegały zwiększeniu wraz z wiekiem badanych zwierząt (tab. 1, 2). U 3 cieląt zaobserwowano zjawisko odwrotne, tzn. antypiryna była szybciej eliminowana (krótszy okres półtrwania) z krwiobiegu w nocy. Także u tych 3 cieląt stwierdzono zwiększanie się różnic między wartościami dla dnia i nocy w wielkości  $t_{0,5}$  i  $Cl_A$  wraz z wiekiem badanych zwierząt (tab. 1, 2). Nie obserwowano natomiast istotnych różnic stężenia początkowego ( $C_0$ ) oraz współczynnika dystrybucji antypiryny ( $\Delta$ ) między średnimi dla okresu dnia i nocy.

Szczegółowe omówienie uzyskanych wyników jest stosunkowo trudne. Brak jest bowiem w dostępnym piśmiennictwie porównywalnych danych dotyczących oceny dobowych wahań aktywności układu monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 u zwierząt gospodarskich. Przegląd nielicznych danych z piśmiennictwa dotyczących farmakokinetyki środków farmakologicznych, metabolizowanych przez enzymy systemu MFO-P-450, wskazuje na istnienie okołodobowych zmian parametrów charakteryzujących absorpcję, dystrybucję, metabolizm i wydalanie leku (6, 9, 10, 14, 21).

Analiza wielkości parametrów farmakokinetycznych antypiryny wskazuje pośrednio na istnienie różnic aktywności monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 u badanych cieląt w czasie godzin dziennych i nocnych. Podobne wyniki uzyskano u szczurów (2, 7) oraz u ludzi (9-12, 14, 29, 30).

Za istnieniem rytmiki okołodobowej biotransformacji szeregu środków farmakologicznych przemawiają także wyniki badań nad aktywnością enzymów kompleksu MFO *in vitro*. Jori i wsp. (16) oraz Radzialowski i Bousquet (26) wykazali m.in., że szybkość N-demetylacji aminopiryny przez monoooksygenazę frakcji mitochondrialnej wątroby szczurów i myszy jest największa o godz. 2.00, a najmniejsza o godz. 14.00. Wykazano również, iż odwrócenie cyklu „światło-ciemność”

Tab. 2. Względne (%) średnie różnice wielkości parametrów farmakokinetycznych antypiryny u badanych cieląt

Wiek cieląt	Dzień - (D) Noc - (N)	$T_{0,5}$	K	$Cl_A$	AUC
		(h)	(h <sup>-1</sup> )	(ml/min/ /kg)	( $\mu$ g/ml·h)
10 dni	D/N n=7	-15	+17	+19	-15
	D/N n=3	+25	-20	-21	+25
20 dni	D/N n=7	-20	+24	+24	-20
	D/N n=3	+30	-23	-25	+33
40 dni	D/N n=7	-24	+26	+25	-22
	D/N n=3	+33	-25	-25	+32

Tab. 3. Średnie „dzienne” i „nocne” wielkości parametrów farmakokinetycznych antypiryny u badanych cieląt (dane dla całej populacji) (n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

Parametr farmakokinetyczny	Wiek cieląt					
	10 dni		20 dni		40 dni	
	Dzień	Noc	Dzień	Noc	Dzień	Noc
$C_0$	33,4 0,6	33,6 0,5	30,6 0,4	30,3 0,4	24,7 0,6	24,3 0,5
$\Delta$	0,74 0,03	0,74 0,03	0,65 0,02	0,66 0,03	0,60 0,02	0,61 0,01
$t_{0,5}$	13,05 1,04	13,66 1,57	11,80 1,09	12,44 2,00	10,84 0,89	12,09 2,27
k	0,053 0,005	0,051 0,004	0,059 0,004	0,055 0,002	0,064 0,005	0,060 0,008
$Cl_A$	0,65 0,06	0,62 0,08	0,63 0,09	0,60 0,11	0,63 0,08	0,60 0,12
AUC	645 54	679 62	530 41	572 44	377 30	404 49

Objaśnienie: średnie „dzienne” i „nocne” wielkości parametrów farmakokinetycznych antypiryny dla całej badanej populacji cieląt nie różnią się istotnie ( $p > 0,05$ ).

powoduje inwersję rytmiki okołodobowej aktywności monoooksygenaz wątrobowych, przy czym jest to szczególnie widoczne w przypadku N-demetylasy aminopiryny i oksydazy hekso-barbitalu (16). Nair i Casper (24) stwierdzili natomiast, iż ciągła ekspozycja zwierząt na światło lub ciemność całkowicie znosi dobową rytmikę aktywności MFO. Wykaza-

no również, iż czynnikiem znoszącym dobowe zmiany aktywności niektórych monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów jest podawanie induktorów tego układu enzymatycznego, np. fenobarbitalu (26) lub 3-metylocholanotrenu (1).

W badaniach przeprowadzonych na szczurach Kagan i wsp. (17) wykazali, iż minimalna zawartość cytochromu P-450 przypada na początek fazy jasnej dobowego cyklu aktywności oraz, że aktywność reduktazy cytochromu P-450 ulega zmianom zgodnym ze zmianami ilości współdziałającego z nią cytochromu. Birt i Hines (3) zaobserwowali natomiast istnienie podobnych dobowych zmian stężenia białka mikrosomalnego i cytochromu P-450 w wątrobie chomika syryjskiego. Należy podkreślić, iż w świetle wyników najnowszych badań coraz więcej zwolenników zyskuje hipoteza sugerująca, iż dobowym zmianom aktywności ulegają jedynie niektóre izoenzymy cytochromu P-450 (22, 34, 35).

Należy mieć również na uwadze fakt, że rytm aktywności enzymów biorących udział w procesach biotransformacji wątrobowej leków związany jest z dobowymi zmianami stężeń niektórych hormonów, zwłaszcza steroidowych (10, 20, 31). Istotną rolę odgrywają szczególnie dobowe zmiany stężenia hydrokortyzonu, hormonu mającego znaczący wpływ na aktywność polimerazy RNA II, a więc pośrednio na powstawanie mRNA w hepatocytach, co z kolei znajduje odbicie w szybkości biosyntezy enzymów mikrosomalnych, w tym i monoooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 (10, 20, 27, 31, 37).

Na podstawie analizy wielkości parametrów farmakokinetycznych antypiryny wśród badanej populacji cieląt wyróżniono 2 podgrupy: u 7 cieląt antypiryna eliminowana była z organizmu szybciej w dzień niż w nocy (dodatnie różnice klirensu metabolicznego od 19 do 25%), natomiast u 3 pozostałych osobników substancja ta ulegała szybszej eliminacji w nocy niż w dzień (ujemne różnice klirensu metabolicznego w granicach od 21 do 26%). Uzyskane wyniki są zbieżne z rezultatami doświadczeń Hartleba i wsp. (11), którzy analizując dobową zmienność szybkości metabolizmu antypiryny u ludzi wyróżnili w badanej populacji podgrupy: „dzienne eliminatory” i „nocne eliminatory”. Autorzy ci stwierdzili jednak istnienie w badanej populacji (n=9) trzeciej podgrupy, tzn. osobników, u których nie obserwowano zmian szybkości eliminacji antypiryny w zależności od pory doby.

Próbując wyjaśnić zaobserwowane w doświadczeniu istnienie „dzienno-nocnych” różnic okresu półtrwania i metabolicznego klirensu antypiryny u cieląt, należy wziąć pod uwagę sugestie zawarte w pracy Hartleba i wsp. (11). Autorzy ci tłumaczą dobową zmienność szybkości metabolizmu antypiryny u ludzi genetycznie uwarunkowanymi różnicami aktywności monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocy-

tów zależnych od cytochromu P-450. Uważają oni, że występowanie „dziennej”, „nocnej” i niezależnych od pory doby „eliminatory” antypiryny jest cechą osobniczą. Podobne zdanie wyraża w swych pracach Vesell (34, 35).

Uzyskane w przeprowadzonym doświadczeniu wyniki wskazują pośrednio, iż aktywność monoooksygenaz mikrosomalnych hepatocytów zależnych od cytochromu P-450 u cieląt wykazuje istotne „dzienno-nocne” różnice. Większość badanej populacji cieląt (70%) charakteryzowało się większą aktywnością tego układu enzymatycznego w ciągu dnia. Odmienne zjawisko zaobserwowano jedynie u 30% badanych cieląt.

## Piśmiennictwo

1. Beil W., Kahl R., Kahl G.: Bioch. Pharmacol. 29, 1201, 1990.
2. Belanger P. M., Dore F., Perusse F., Labrecque G.: Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 30, 243, 1990.
3. Birt D. F., Hines L. A.: Drug-Nutr. Interact. 1, 143, 1982.
4. Brodie B. B., Axelrod J., Soberman R., Levy B.: J. Biol. Chem. 179, 25, 1949.
5. Brunner L. J., Di Piro J. T., Feldman S.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 345, 1995.
6. Bruguerolle B., Lemmer B.: Life Sci. 52, 1809, 1993.
7. Chedid A., Nair V.: Science, 175, 176, 1972.
8. Danhof M., Teunissen M. W.: Pharm. Int. 5, 11, 1984.
9. Gries J. M., Benowitz N., Verotta D.: Clin. Pharmacol. Ther. 60, 385, 1996.
10. Guskova T., Liberman S.: Farmakol. Toksikol. 4, 111, 1987.
11. Hartleb M., Markiewicz A., Rudzki K., Nowak S., Bołdys H., Kacperk T.: Pol. Arch. Med. Wewn. 77, 264, 1987.
12. Hartleb M., Markiewicz A., Rudzki K., Nowak S., Bołdys H., Kacperk T.: Pol. Arch. Med. Wewn. 77, 264, 1987.
13. Hartleb M.: Biopharm. Drug Disp. 12, 559, 1991.
14. Haschiguchi M., Fujimura A., Ohashi K., Ebihara A.: J. Clin. Pharmacol. 32, 184, 1992.
15. Holcslaw T. L., Miya T. S., Bousquet W. F.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 195, 20, 1975.
16. Jori A., Di Salle E., Santini V.: Bioch. Pharmacol. 20, 2965, 1981.
17. Kagan V. E., Kozlov Yu. P., Bilenko M. V., Stepanova L. I., Serbinova E. A., Velikanova D. M., Savov V. M.: Biol. Nauk. 11, 26, 1991.
18. König P. K., Cantilena L.: Arch. Int. Med. 154, 590, 1994.
19. Krzyżak G., Plewka A., Czekaj P., Kamiński M.: Folia. Med. Cracov. 31, 237, 1990.
20. Labrecque G., Belanger P. M.: Pharmacol. Ther. 52, 95, 1991.
21. Lemmer B., Nold G.: Br. J. Clin. Pharmacol. 32, 627, 1991.
22. Loft S.: Pharmacol. Toxicol. 66, (supl. 6), 1, 1990.
23. Markiewicz A.: Pol. Tyg. Lek. 51-52, 1611, 1983.
24. Nair V., Casper R.: Life Sci. 8, 1291, 1969.
25. Quay W. B.: Pineal Res. Rev. 4, 183, 1986.
26. Radzialovski M. F., Bousquet W. F.: J. Pharm. Exp. Ther. 163, 229, 1968.
27. Ritschel W. A., Forusz H.: Met. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 16, 57, 1994.
28. Schweiger H. G.: Eur. J. Cell Biol. 21, 335, 1990.
29. Shively C. A., Vesell E. S.: Clin. Pharmacol. Ther. 18, 413, 1975.
30. Shively C. A., Simons R. J., Passananti T., Dvorchik B. H., Vesell E. S.: Clin. Pharmacol. Ther. 29, 65, 1981.
31. Sieradzki J.: Pol. Tyg. Lek. 10, 293, 1983.
32. Starek A., Rachtan R., Piekoszewski W.: Folia Med. Cracov. 31, 251, 1990.
33. Vesell E. S., Shively C. A., Passananti T.: Clin. Pharmacol. Ther. 22, 843, 1977.
34. Vesell E. S.: Clin. Pharmacol. Ther. 50, 239, 1991.
35. Vesell E. S., De Angelo T. M., Katz I. R.: Clin. Pharmacol. Ther. 54, 150, 1993.
36. Wiela A., Orzechowska-Juzwenko K.: Post. Hig. 41, 136, 1987.
37. Wolfe G. W., Schnell R. C.: Pharmacology 19, 116, 1989.