

Klinika Gastroenterologii. Instytut Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jan Pokora
Zakład Farmakologii. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zdzisław Kleinrok

Janusz CZARNECKI, Jan POKORA,
Daniel CHIBOWSKI, Piotr RADWAN,
Krzysztof CELIŃSKI, Zofia SIEZIENIEWSKA,
Anna CHODKOWSKA

**Badania doświadczalne nad wpływem imuranu (Azathioprine)
na zawartość hydroksyproliny w płynie perfundującym
izolowaną wątrobę szczurów zdrowych i po przewlekłym zatruciu CCl_4**

Экспериментальные исследования влияния имурана (Azathioprine)
на содержание гидроксипролина в перфузирующем растворе
изолированной печени здоровых крыс после длительного отравления CCL_4

Experimental Examinations of the Influence of Imuran (Azathioprine)
on the Contents of the Hydroxyproline in the Liquid Penetrating the Isolated Liver
of the Healthy Rats and the Rats after the Lasting Intoxication of CCl_4

W większości przypadków przewlekłych zapaleń wątroby konsekwencją toczącego się procesu zapalnego jest mniej lub bardziej intensywny rozwój tkanki łącznej z przebudową struktury zrazika, tworzeniem się tzw. przegród biernych i rozwojem guzków regeneracyjnych jako morfologicznego wykładnika zmian marskich (2, 9, 19). Rozwój tych zmian można śledzić w różny sposób, najprościej — oceniając preparaty mikroskopowe z okresowo pobieranych biopunktów wątroby, a pośrednio również oceniając we krwi i w moczu stężenie hydroksyproliny (h.p.w.), aminokwasu w zasadzie swoistego dla kolagenu ssaków (2, 5, 7, 8, 10, 13). W wątrobie, według McGee i wsp. (10), za syntezę hydroksyproliny odpowiedzialny jest swoisty enzym — hydroksylaza proliny kolagenu (10). Ocena aktywności tego enzymu w biopunktach wątroby zwiększyła dotychczasowe możliwości śledzenia dynamiki procesu włóknienia w wątrobie w przebiegu jej schorzeń (9, 10). Wśród przewlekłych zapaleń szczególne zain-

teresowanie budzi przewlekłe aktywne zapalenie wątroby (p.a.z.w.) z uwagi na niejednorodną i nie wyjaśnioną etiopatogenezę, różne rokowanie i niejednolite poglądy dotyczące leczenia (1, 2, 13, 15). Wychodząc z założenia, że p.a.z.w. jest zapaleniem immunologicznym, uruchamianym najczęściej przez replikację wirusa do wnętrza komórki i podtrzymywanym przez mechanizmy autoagresywne, większość autorów uważa przewlekłe stosowanie enkortonu i imuranu za podstawowe leczenie tego schorzenia, mimo że postępowanie takie budzi nadal szereg kontrowersji (2, 15). Jak wynika z obserwacji klinicznych oraz okresowej oceny morfologicznej biopunktatów wątroby, u części leczonych chorych wraz z poprawą kliniczną występuje remisja zmian morfologicznych stwierdzanych przed leczeniem (15). W dość licznych jednak przypadkach poprawa nie występuje, stwierdzone na początku leczenia zmiany morfologiczne utrzymują się nadal, a u części leczonych w kontrolnych biopunktatach stwierdza się rozwój zmian marskich (1, 2, 13, 15). Interpretacja tak różnego przebiegu p.a.z.w. jest trudna i zależy od szeregu czynników, jak: różna etiopatogeneza, rodzaj zapalenia, stan i wydolność układów immunologicznych, wpływ na te układy stosowanych leków, stan morfologiczny wątroby przed zachorowaniem, miejscowe przeciwzapalne działanie enkortonu i ewentualnie imuranu oraz wpływ tych leków na niektóre procesy metaboliczne komórki mięszkowej wątroby. Jednak wydaje się, że w tym tak złożonym łańcuchu patogenetycznym wpływ stosowanych leków na procesy biochemiczne toczące się w uszkodzonych hepatocytach i na rozwój tkanki łącznej stanowi istotne ogniwo i nadal jest problemem otwartym (3, 4, 6, 12). Dotyczy to zarówno p.a.z.w., jak i innych rodzajów zapaleń, których konsekwencją jest rozwój tkanki łącznej w wątrobie (3, 4, 13). Opierając się na przedstawionych przesłankach, podjęliśmy badania doświadczalne nad wpływem imuranu oraz imuranu w interakcji z induktorami enzymatycznymi, tj. enkortonem i fenobarbitaliem, na zawartość h.p.w. w płynie perfundującym izolowaną wątrobę zdrowych szczurów oraz wątrobę uszkodzoną przewlekłym stosowaniem CCl_4 .

MATERIAŁ

Materiał stanowiły szczury, samce szczepu Wistar, o c.c. 250—270 g, w wieku 5—7 mies. Pierwsza część badań (cz. I b.) obejmowała 50 zdrowych szczurów, zaś druga część badań (cz. II b.) 50 szczurów, u których wątrobę uszkodzono w sposób przewlekły, podając dootrzewnowo co 7 dni przez 12 tygodni 0,1 ml CCl_4 . Szczury cz. I b. oraz cz. II b. w zależności od stosowanego leku czy leków podzielono na 5 grup doświadczalnych, oznaczonych symbolami literowymi A, B, C, D i E, po 10 zwierząt w każdej grupie. Cyfra I przed symbolem literowym grupy oznacza jej przynależność do cz. I b., a cyfra II do cz. II b. Zarówno w cz. I b., jak i w

cz. II b. dawki leków były takie same, a czas ich stosowania wynosił 14 dni, z tym, że u szczurów cz. II b. podawanie leków rozpoczynano dopiero po zakończeniu uszkodzenia wątroby przez CCl_4 , tj. po 12 tygodniach. Zwierzęta w grupach IA i IIA nie otrzymywały żadnego leku (grupy kontrolne), w grupach IB i IIB podawano dootrzewnowo imuran (2 mg/kg c.c.), w grupach IC i IIC imuran (2 mg/kg c.c.) + fenobarbital (5 mg/kg c.c.), w grupach ID i IID imuran (2 mg/kg) + enkorton (1 mg/kg c.c.), a w grupach IE i IIE imuran (2 mg/kg c.c.) + enkorton (1 mg/kg c.c.) + fenobarbital (5 mg/kg c.c.). Wszystkie zwierzęta pozostawały na jednakowej diecie standardowej i w jednakowych warunkach.

Po zakończeniu stosowania leków, tj. 15 dnia, zwierzęta usypiano, a ich izolowane wątroby perfundowano przez 2 godz., według metody Millera w modyfikacji Hafta (11). Po 2 godz. perfuzji w płynie perfundującym oznaczano stężenie h.p.w., według Prockopa i Udenfrienda w modyfikacji Kovirikko (14). Z każdej z grup doświadczalnych cz. I i II b. wątroby wybranych losowo 2 zwierząt nie były perfundowane. Sporządzano z nich preparaty mikroskopowe barwione E+H dla oceny zmian morfologicznych. Uzyskane wyniki z oznaczeń h.p.w. poddano analizie statystycznej według testu *t* Studenta.

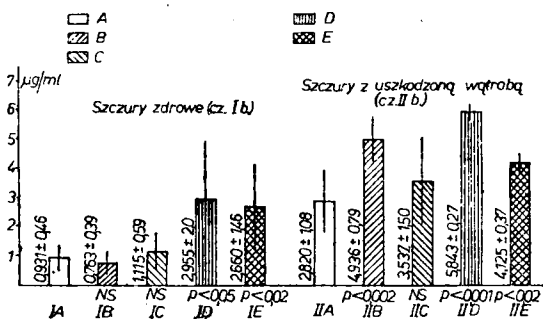
WYNIKI

Uzyskane wyniki badań zestawiono w tab. 1 i na ryc. 1. W cz. I b. w grupie kontrolnej IA stężenie h.p.w. w płynie perfundującym wynosiło $0,931 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$ i nie różniło się w sposób znamienny od stężenia h.p.w. w grupach IB i IC. Natomiast w grupach ID i IE stężenie h.p.w. w płynie perfundującym było znamiennie wyższe niż w grupie kontrolnej IA ($p < 0,05$ i $p < 0,02$). Różnica między stężeniami h.p.w. w perfuzatach grup ID i IE nie była statystycznie znamienna. Ocena mikroskopowa wątroby szczurów z poszczególnych grup doświadczalnych cz. I b. nie wykazała żadnych zmian patologicznych. We wszystkich preparatach stwierdzono prawidłową budowę drobnowidową wątroby. Analiza mikroskopowa preparatów z wątroby zwierząt grup doświadczalnych cz. II b. wykazała, że w następstwie przewlekłego stosowania CCl_4 powstały jednakowe zmiany morfologiczne, polegające na stłuszczeniu hepatocytów, wyraźnym włóknieniu i naciekach zapalnych w okolicy triad, powstawaniu tzw. przegród biernych i pojedynczych guzków regeneracyjnych.

U szczurów cz. II b. w grupach IIB, IID i IIE stężenie h.p.w. w płynie perfundującym było statystycznie znamiennie wyższe niż w grupie kontrolnej IIA ($p < 0,002$, $p < 0,001$ i $p < 0,02$). Natomiast różnica między stężeniem h.p.w. w perfuzatach grup IIA i IIC nie była statystycznie znamienna. Najwyższe stężenie h.p.w. w płynie perfundującym w cz. II b. stwierdzono w grupie IID ($5,843 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$). Było ono statystycznie znamiennie wyższe niż stężenie h.p.w. w perfuzatach pozostałych grup doświadczalnych cz. II b. ($p < 0,001$, $p < 0,02$, $p < 0,005$).

Tab. 1. Różnica między średnimi stężeniami hydroksyproliny wolnej (h.p.w.) w perfuzatach wątroby grup doświadczalnych
Difference between the average concentration of free hydroxyproline (h.p.w.) in the perfusates of the experimental groups liver

Grupy badanych szczurów	Średnie stężenie h.p.w. $\bar{x} \pm SD$ $\mu\text{g/ml}$	Istotność statystyczna różnicy		
		Grupy porównywane	Znaczenność statystyczna różnicy	
Szczury zdrowe /cz. I b./	/IA/ grupa kontrolna	0,931 \pm 0,46	IA/IB IA/IC IA/IE	t = 0,774 NS t = 0,69 NS t = 2,72 p < 0,05
	/IB/ imuran /2 mg/kg c.c./ przez 14 dni	0,763 \pm 0,39	IA/IE IB/IC	t = 3,192 p < 0,02 t = 1,811 NS
	/IC/ imuran /2 mg/kg c.c./ przez 14 dni + fenobarbital /5 mg/kg c.c./	1,115 \pm 0,59	IB/ID IB/IE	t = 2,965 p < 0,02 t = 3,544 p < 0,01
	/ID/imuran /2 mg/kg c.c./ + enkorton /1 mg/kg c.c./	2,955 \pm 2,0	IC/ID IC/IE	t = 2,437 p < 0,05 t = 2,776 p < 0,05
	/IE/imuran /2 mg/kg c.c./ + enkorton /1 mg/kg c.c./ + fenobarbital /5 mg/kg c.c./	2,66 \pm 1,46	ID/IE IIA/IIB	t = 0,359 NS t = 4,922 p < 0,002
Szczury zatrute CCl ₄ /cz. II b./	/IIA/ grupa kontrolna	2,82 \pm 1,08	IIA/IIIC IIA/IIID	t = 1,399 NS t = 7,611 p < 0,001
	/IIB/imuran /2 mg/kg c.c./ przez 14 dni	4,936 \pm 0,79	IIA/IIIE IIB/IIIC	t = 3,205 p < 0,02 t = 2,853 p < 0,02
	/IIC/imuran /2 mg/kg c.c./ przez 14 dni + fenobarbital /5 mg/kg c.c./	3,537 \pm 1,50	IIB/IIID IIB/IIIE	t = 3,041 p < 0,02 t = 2,605 p < 0,05
	/IID/imuran /2 mg/kg c.c./ + enkorton /1 mg/kg c.c./	5,843 \pm 0,27	IIC/IID IIC/IIIE	t = 4,255 p < 0,005 t = 1,070 NS
	/IIE/imuran /2 mg/kg c.c./ + enkorton /1 mg/kg c.c./ + fenobarbital /5 mg/kg c.c./	4,125 \pm 0,37	IID/IIIE	t = 11,768 p < 0,001



Ryc. 1. Średnie stężenie h.p.w. w $\mu\text{g/ml}$ perfuzatu wątroby w grupach szczurów zdrowych i szczurów po przewlekłym zatruciu CCl₄; A — grupa kontrolna, B — imuran (2 mg/kg c.c.), C — imuran (2 mg/kg c.c.) + fenobarbital (5 mg/kg c.c.), D — imuran (2 mg/kg c.c.) + enkorton (1 mg/kg c.c.), E — imuran (2 mg/kg c.c.) + enkorton (1 mg/kg c.c.) + fenobarbital (5 mg/kg c.c.)

The average concentration of h.p.w. in $\mu\text{g/ml}$ of liver perfusates in the groups of healthy rats and in the groups after lasting intoxication with CCl₄; A — control group, B — imuran (2 mg/kg body weight), C — imuran (2 mg/kg body weight) + fenobarbital (5 mg/kg body weight), D — imuran (2 mg/kg body weight) + encorton (1 mg/kg body weight), E — imuran (2 mg/kg body weight) + encorton (1 mg/kg body weight) + fenobarbital (5 mg/kg body weight)

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Interpretacja uzyskanych wyników jest trudna i na obecnym etapie badań może budzić szereg wątpliwości. Wydaje się, że należy brać pod uwagę dwa prawdopodobne kierunki i mechanizmy działania użytych w badaniach leków oraz ich wpływ na stężenie h.p.w. w płynie perfundującym (4). Jeden kierunek działania to bezpośredni wpływ na sam proces włóknienia i formowania się tkanki łącznej w zrębie wątroby (13). Wiadomo, że enkorton cechuje między innymi wyraźne ogólne i miejscowe działanie przeciwzapalne, zmniejszanie nacieków zapalnych i hamowanie fibrogenyzy (13, 15). W przewlekłych zapaleniach wątroby o podłożu immunologicznym korzystne działanie imuranu polega głównie na działaniu immunosupresyjnym i pośrednio tą drogą na miejscowym działaniu przeciwzapalnym (1, 2, 13, 15). Natomiast jego wpływ na fibrogenezę jest wątpliwy i ciągle dyskusyjny (2, 6). Jeśli chodzi o fenobarbital, to nie wykazuje on ani działania przeciwzapalnego, ani immunosupresyjnego, natomiast jego wpływ na proces włóknienia w wątrobie nie jest dokładnie określony, a możliwość takiego działania jest sygnalizowana tylko w pojedynczych doniesieniach (12). Gdyby jednak ograniczyć sprawdzenie działania stosowanych w badaniach leków do ich wyłącznego wpływu na tkankę zrębu wątroby, to stwierdzane różnice w stężeniach h.p.w. w płynie perfundującym powinny przebiegać równolegle z mniej lub bardziej nasilonymi zmianami morfologicznymi w ocenianych preparatach mikroskopowych z wątroby zwierząt poszczególnych grup doświadczalnych. Wprawdzie u szczurów z uszkodzoną wątrobą (cz. II b.) stężenie h.p.w. w perfuzatach było wyższe niż u szczurów zdrowych, ale z kolei wywołane przez CCl_4 zmiany morfologiczne były takie same w grupie IIA, w której nie podawano żadnych leków, jak i w grupach, w których leki stosowano. U szczurów zdrowych (cz. I b.), zarówno w grupie kontrolnej, jak i w pozostałych grupach, nie stwierdzono żadnych, nawet minimalnych, odchyłeń od prawidłowej budowy drobnowidowej wątroby, a różnice w stężeniach h.p.w. w płynie perfundującym dwu z pięciu ocenianych grup były znamienne. W świetle tych rozważań i uzyskanych wyników wydaje się, że tłumaczenie mechanizmu działania użytych w doświadczeniach leków wyłącznie ich wpływem na fibrogenezę w zrębie wątroby w aspekcie jej przyspieszenia czy hamowania nie jest wystarczające. Pozostaje więc do rozważenia druga możliwość, mianowicie bezpośredni ich wpływ na komórkę wątrobową oraz jej procesy metaboliczne i tą drogą na syntezę h.p.w. w wątrobie (3, 4, 6). W badaniach doświadczalnych nad wpływem induktorów enzymatycznych na zawartość h.p.w. w płynie perfundującym stwierdzono, że u zdrowych szczurów fenobarbital powodował wyraźny wzrost stężenia h.p.w. (4). W poprzed-

nich pracach wykazano również możliwość indukującego wpływu imuranu na siateczkę endoplazmatyczną zdrowych i uszkodzonych komórek wątrobowych (3). U szczurów zdrowych indukujące działanie imuranu nie było znamienne, natomiast w interakcji z enkortonem — bardzo wyraźne (3). U szczurów z uszkodzoną wątrobą imuran wykazywał silne działanie indukujące, które zwiększało się jeszcze w interakcji z enkortonem i fenobarbitalem (3). W obecnych badaniach daje się zauważyć pewna zbieżność uzyskanych danych z wynikami badań nad indukującym działaniem imuranu (3). U szczurów zdrowych, otrzymujących przed perfuzją imuran, stężenie h.p.w. w perfuzatach nie zmieniło się, natomiast wzrosło wyraźnie w następstwie równoczesnego stosowania imuranu z enkortonem i fenobarbitalem. U szczurów z uszkodzoną wątrobą, otrzymujących przed perfuzją imuran, stężenie h.p.w. w perfuzatach było wyraźnie wyższe niż w grupie kontrolnej, a zwiększało się istotnie w następstwie równoczesnego stosowania imuranu z enkortonem. W świetle tych faktów można stwierdzić możliwość indukującego wpływu imuranu, zwłaszcza w interakcji z enkortonem oraz częściowo z fenobarbitalem, między innymi na hydroksylazę proliny kolagenu bądź też inne mechanizmy metaboliczne w komórce wątrobowej, odpowiedzialnej za produkcję, a, być może, także uwalnianie hydroksyproliny do płynu perfundującego (9). Ostateczne wyjaśnienie tych istotnych, jak się wydaje, mechanizmów wymaga jednak dalszych, dodatkowych badań.

Wnioski

1. U szczurów zdrowych imuran z enkortonem oraz imuran i enkorton w interakcji z fenobarbitalem powodują wzrost stężenia h.p.w. w płynie perfundującym izolowaną wątrobę.

2. U szczurów z wątrobą uszkodzoną przewlekłym dootrzewnowym podawaniem CCl_4 imuran podawany zwierzętom przed perfuzją, a zwłaszcza imuran w interakcji z enkortonem w znacznym stopniu zwiększają stężenie h.p.w. w płynie perfundującym.

3. U szczurów z uszkodzoną wątrobą interakcja imuranu oraz imuranu i enkortonu z fenobarbitalem zmniejsza stężenie h.p.w. w perfuzatach wątroby w porównaniu z grupami doświadczalnymi, w których zwierzętom podawano imuran oraz imuran z enkortonem bez fenobarbitalu.

PIŚMIENNICTWO

1. Boye N. P. i wsp.: Azathioprine Treatment in Active Chronic Hepatitis. *Scand J. Gastroenterol. suppl.* 16/19, 1972.
2. Brunner C. i wsp.: Controlled Trial of Azathioprine in Chronic Agressive Hepatitis. *Digest.* 6, 246, 1972.
3. Czarniecki J. i wsp.: Krzywa eliminacji amidopiryny (Aminophenazone) jako wskaźnik indukcji enzymatycznej siateczki endoplazmatycznej perfundowanej wątroby szczurów. *Pol. Tyg. Lek.* 34, 125, 1978.
4. Czarniecki J. i wsp.: Wpływ indukcji enzymatycznej na zawartość hydroksyproliny w płynie perfundującym izolowaną wątrobę zdrowych szczurów i szczurów po przewlekłym zatruciu CCl_4 . *Pol. Tyg. Lek.* (w druku).
5. Fischer J. A. i wsp.: Treatment of Primary Biliary Cirrhosis with Azathioprine. *Lancet* 1, 421, 1967.
6. Gelehrt T. D.: Enzyme Induction. *New. Engl. J. Med.* 294, 522, 1976.
7. Hanzlik J. i wsp.: Hydroksyprolina we krwi i w moczu chorych na wirusowe zapalenie wątroby. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 40, 237, 1978.
8. Jasłowski J., Jarmuszczyk Z.: Poziom proliny w surowicy i wydzielenie hydroksyproliny z moczem w przewlekłych chorobach wątroby. *Materiały 50 Posiedz. Nauk. Pol. Tow. Gastroenterol. Szczecin* 1982.
9. Mata J. M. i wsp.: Serum Free Proline and Free Hydroxyproline in Patients with Chronic Liver Disease. *Gastroenterology* 68, 1265, 1975.
10. McGee i wsp.: Collagene Proline Hydroxylase Activity and ^{35}S Sulphate Uptake in Human Liver Biopsies. *Gut.* 15, 260, 1974.
11. Miller L. L.: Technique of Isolated Liver Rat Perfusion [w:] *Isolated Liver Perfusion and Its Applications.* Red. Bartosek i wsp., Raven Press, New York 1973.
12. Popper H.: Abstract of Abstracts 1981. *Hepatology* 1982, 1 st. Quarter Falk Fund, Freiburg.
13. Popper H., Udenfriend S.: Hepatic Fibrosis, Correlation of Biochemical and Morphologic Investigations. *Amer. J. Med.* 49, 707, 1970.
14. Tomaszewski J., Hanzlik J.: Oznaczanie hydroksyproliny w surowicy krwi. *Diagn. Lab.* 7, 183, 1971.
15. Weller I. V. D. i wsp.: Effects of Prednisolone (Azathioprine) in Chronic Hepatitis B Viral Infections. *Gut.* 23, 650, 1982.

Otrzymano 30 VII 1984.

РЕЗЮМЕ

У 50 здоровых крыс и 50 крыс с печенью, пораженной длительным внутрибрюшинным введением CCl_4 , исследовалось влияние имурана (Azathioprine), а также его интеракцию с энкортоном и фенobarбиталом, на содержание свободного гидроксипролина (h.p.w.) в перфузирующем растворе изолированной печени. Констатировано, что у здоровых крыс в результате применения имурана с энкортоном, а также имурана и энкортона с фенobarбиталом насыщенность (h.p.w.) в перфузирующем растворе увеличивается. У крыс с поврежденной печенью имуран вводимый животным до перфузии печени вызывал значительное повышение насыщенности h.p.w. в перфузаторах. Самое большое повышение выступило в ре-

зультате интеракции имурана с энкортоном. Интеракция имурана с фенобарбиталом, а также имурана и энкортона с фенобарбиталом, вызывала понижение насыщенности h.p.w. в перфузирующих растворах по сравнению с группами в которых животным вводился имуран и имуран с энкортоном без фенобарбитала. Среди возможных механизмов действия лекарств и их влияния на насыщенность h.p.w. в перфузаторах принималось во внимание также индукцию гидроксилазы пролина коллагена в печени.

S U M M A R Y

In 50 healthy rats and in 50 rats with the injured liver by the lasting application of CCl_4 to the peritoneum was examined the influence of the imuran (Azathioprine) and its interaction with encorton and fenobarbital on the contents of the free hydroxyproline (h.p.w.) in the liquid penetrating the isolated liver. It was stated that the healthy rats in the consequence of the application of imuran with encorton and encorton with fenobarbital the concentration h.p.w. in the penetrating liquid increases. In the rats with the injured liver imuran applicated the animals before the perfusion of the liver caused the distinct increase of the concentration h.p.w. in the perfusates. This increase was the greatest in the consequence of the interaction of imuran with encorton. The interaction of imuran with fenobarbital and imuran and encorton with fenobarbital caused the decrease of the concentration h.p.w. in the penetraing liquid as compared with the groups in which the animals got the imuran and imuran with encorton without fenobarbital. Among the possible mechanisms of the action of the drugs and their influence on h.p.w. concentration in perfusates the induction of hydroxylases of colagen proline in the liver was taken into consideration.