

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

**Wpływ indukcji enzymatycznej na zawartość hydroksyproliny  
w płynie perfundującym izolowaną wątrobę zdrowych szczurów  
i szczurów po przewlekłym zatruciu  $\text{CCl}_4$**

Влияние индукции биокатализаторов на содержание гидроксипролина  
в перфузирующих растворах изолированной печени здоровых крыс  
и крыс после длительного отравления  $\text{CCl}_4$

The Influence of Enzymatic Induction on the Contents of Hydroxyproline  
in the Liquid Penetrating the Isolated Liver of Healthy Rats and of the Rats  
After the Lasting Intoxication with  $\text{CCl}_4$

Hydroksyprolina jest aminokwasem prawie specyficznym dla kolagenu ssaków, a jej poziom we krwi i w moczu obrazuje pośrednio aktywność metabolizmu kolagenu ustrojowego, zwłaszcza w narządach o dużej zawartości tkanki łącznej (2, 4, 5). W wątrobie hydroksyprolina wolna (h.p.w.) produkowana jest w hepatocytach, a synteza tego aminokwasu jest aktywowana przez swoisty enzym — hydroksylazę proliny kolagenu (3, 10). Zmiany w stężeniu h.p.w. we krwi i w moczu chorych z ostrymi i przewlekłymi schorzeniami wątroby były tematem szeregu doniesień (2, 5, 7, 9). Autorzy na ogół zgodnie podkreślają, że w przypadkach, gdy w wątrobie dochodzi do aktywnej fibrogenезy, to poziom h.p.w. we krwi i w moczu wzrasta (4, 5, 7, 9). Szczególnie wysokie wartości h.p.w. we krwi i w moczu stwierdzili u chorych z alkoholowym zapaleniem wątroby M a t a i wsp. (9). Duże znaczenie kliniczne ma dokładne śledzenie dynamiki rozwoju tkanki łącznej w wątrobie w przebiegu jej schorzeń, a

zwłaszcza wpływu leków na ten proces, co sprawia, że jest to ciągle problem bardzo aktualny (8, 12). Wydaje się jednak, że interpretacja uzyskanych wyników również w cytowanych badaniach jest trudna, gdyż, jak wspomniano, poziom h.p.w. we krwi i w moczu pośrednio tylko obrazuje metabolizm kolagenu ustrojowego, a nie tylko w wątrobie (4, 5). Większe możliwości w tym względzie, jak się wydaje, stwarzają warunki doświadczalne, a zwłaszcza zastosowany przez nas model perfuzji izolowanej wątroby szczurów zdrowych oraz szczurów z wątrobą uszkodzoną przewlekłym stosowaniem  $\text{CCl}_4$  (1). Skłoniło to nas do podjęcia obecnej pracy, której celem jest ocena przydatności tego modelu do badań doświadczalnych nad metabolizmem kolagenu wątrobowego oraz określenie wpływu indukcji enzymatycznej na zawartość h.p.w. w płynie perfundującym.

### MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły białe szczury szczepu Wistar, o c.c. 250—270 g, w wieku 5—7 mies. Badania składały się z dwu części. Pierwsza część badań (cz. I b.) obejmowała 40 zdrowych szczurów, a część druga badań (cz. II b.) również 40 szczurów, u których wątrobę uszkadzano przy użyciu  $\text{CCl}_4$ . Uszkodzanie wątroby odbywało się w sposób przewlekły. Zwierzęta otrzymywały 0,1 ml  $\text{CCl}_4$  dootrzewnowo co 7 dni przez 12 tygodni. Szczury cz. I b. oraz cz. II b. w zależności od otrzymanego leku czy leków podzielono na 4 grupy doświadczalne, oznaczone symbolami literowymi A, B, C i D, po 10 zwierząt w każdej grupie. Cyfra I przed symbolem literowym każdej grupy oznacza jej przynależność do cz. I b., a cyfra II — przynależność do cz. II b. Zarówno w cz. I b., jak i w cz. II b. rodzaj oraz dawki leku czy leków były identyczne, a czas ich stosowania wynosił 14 dni, jednak u szczurów w cz. II b. podawanie leków rozpoczynano dopiero po zakończeniu stosowania  $\text{CCl}_4$ , tj. po upływie 12 tygodni. Zwierzęta grup IA i IIA nie otrzymywały żadnego leku (grupy kontrolne dla cz. I i II b.). W grupach IB i IIB podawano dootrzewnowo fenobarbital (w dawce 5 mg/kg c.c.), w grupach IC i IIC enkorton (1 mg/kg c.c.), a w grupach ID i IID enkorton (1 mg/kg) + fenobarbital (5 mg/kg c.c.). Wszystkie zwierzęta przebywały w jednakowych warunkach i otrzymywały taką samą standardową dietę. 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-godzinnej perfuzji w płynie perfundującym oznaczano stężenie h.p.w., według Prockopa i Udinfrienda w modyfikacji Kovirikko (13). 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 oznaczeń h.p.w. w perfuzatach poddano analizie statystycznej według testu t Studenta.

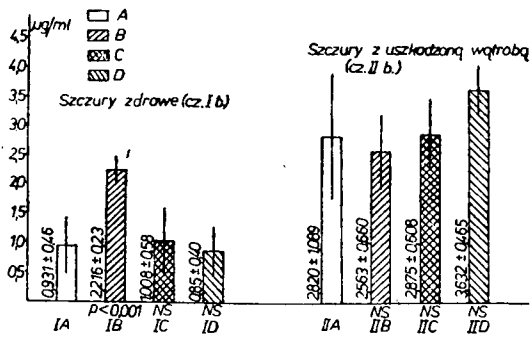
## WYNIKI

Uzyskane wyniki 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 IC i ID. Natomiast w grupie IB, w której zwierzęta przed perfuzją otrzymywały fenobarbital, stężenie h.p.w. w płynie perfundującym wynosiło  $2,216 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$  i było znamienne wyższe niż w pozostałych grupach doświadczalnych cz. I b. ( $p < 0,001$ ). Ocena mikroskopowa

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

Grupy badanych szczurów		Średnie stężenie h.p.w. $\bar{x} \pm \text{SD} \mu\text{g/ml}$	Istotność statystyczna różnicy	
			Grupy porównywane	Znamiennosc statystyczna różnicy
Szczury zdrowe	/IA/ grupa kontrolna	$0,931 \pm 0,465$	IA/IB IA/IC IA/ID	$t = 6,956$ $p < 0,001$ $t = 0,292$ NS $t = 0,571$ NS
	/IB/ fenobarbital /5 mg/kg c.c./ przez 7 dni	$2,216 \pm 0,237$	IIA/IIB IIA/IIC IIA/IID	$t = 0,569$ NS $t = 0,125$ NS $t = 1,940$ NS
	/IC/ enkorton /1 mg/kg c.c./ przez 14 dni	$1,008 \pm 0,589$	IA/IIA IB/IIB IC/IIC	$t = 4,510$ $p < 0,002$ $t = 1,400$ NS $t = 6,232$ $p < 0,001$
	/ID/ enkorton + fenobarbital	$0,850 \pm 0,406$	ID/IID IB/IC IB/IC	$t = 12,573$ $p < 0,001$ $t = 1,5372$ $p < 0,001$ $t = 9,724$ $p < 0,001$
Szczury estrute CCl <sub>4</sub>	/IIA/ grupa kontrolna	$2,820 \pm 1,089$	IC/ID IIB/IIC IIB/IID	$t = 0,489$ NS $t = 0,980$ NS $t = 3,741$ $p < 0,01$
	/IIB/ fenobarbital /5 mg/kg c.c./ przez 7 dni	$2,563 \pm 0,660$	IIC/IID	$t = 3,458$ $p < 0,01$
	/IIC/ enkorton /1 mg/kg c.c./ przez 14 dni	$2,875 \pm 0,608$		
	/IID/ enkorton + fenobarbital	$3,632 \pm 0,465$		

wątroby szczurów poszczególnych grup doświadczalnych cz. I b. wykazywała budowę prawidłową, bez zmian patologicznych. U szczurów w cz. II b. w grupach IIA, IIC i IID stężenie h.p.w. w perfuzatach było znamienne wyższe niż w analogicznych grupach doświadczalnych szczurów zdrowych cz. I b. Jedynie różnica między stężeniami h.p.w. w płynie perfundującym w grupach IB i IIB nie była statystycznie znamienna. Nie stwierdzono żadnej różnicy statystycznej między stężeniami h.p.w. w perfuzatach zwierząt grupy IIA a pozostałymi grupami doświadczalnymi cz. II b. Ocena mikroskopowa preparatów z wątroby szczurów z poszczególnych grup doświadczalnych cz. II b. wykazała, że w następstwie przewlekłego stosowania CCl<sub>4</sub> powstały jednakowe zmiany morfologiczne,



Ryc. 1. Średnie stężenie h.p.w. w µg/ml perfuzatu wątroby w grupach szczurów zdrowych i szczurów po przewlekłym zatruciu CCl<sub>4</sub>; A — grupa kontrolna, B — fenobarbital (5 mg/kg c.c.), C — enkorton (1 mg/kg c.c.), D — enkorton + fenobarbital

Mean concentration of h.p.w. in µg/ml of liver perfusates in the groups of healthy rats and in the groups after lasting intoxication with CCl<sub>4</sub>; A — control group, B — fenobarbital (5 mg/kg body weight), C — encorton (1 mg/kg body weight), D — encorton + fenobarbital

polegające na stłuszczeniu hepatocytów, wyraźnym włóknieniu i naciekach zapalnych w okolicy triad oraz powstaniu tzw. przegród biernych i pojedynczych guzków regeneracyjnych.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykonana praca wykazała przydatność modelu perfuzji izolowanej wątroby szczurów do badań doświadczalnych nad metabolizmem kolagenu wątrobowego. W płynie perfundującym h.p.w. mogła bowiem pochodzić wyłącznie z wątroby, a stwierdzone różnice w jej poziomach mogą być tłumaczone zmianami morfologicznymi w wątrobie, wpływem stosowanych uprzednio leków bądź obu czynników równocześnie (11). Stosując u zwierząt przed perfuzją różne leki i uszkodzając wątrobę w różnym stopniu można wnikliwiej niż dotychczas, opierając się na oznaczeniach h.p.w. w perfuzatach, śledzić metabolizm kolagenu w tkance wątrobowej. W przeprowadzonych badaniach u szczurów z nie uszkodzoną wątrobą (cz. I b) i u szczurów z wątrobą uszkodzoną przewlekłym stosowaniem CCl<sub>4</sub> stosowano przed perfuzją induktory enzymatyczne, tj. fenobarbital, enkorton i obydwie leki równocześnie, starając się ocenić ich wpływ na stężenie h.p.w. w perfuzatach (1). Postępowanie takie wynikało częściowo z dniesień McGee i wsp., według których za syntezę h.p.w. w wątrobie odpowiedzialny jest swoisty enzym — hydroksylaza proliny kolagenu (10). Można było przypuszczać, że stosowane w badaniach induktory enzymatyczne, indukując w wątrobie enzymy aktywujące niektóre procesy

metaboliczne, mogą również indukować hydroksylazę proliny kolagenu, co znajdzie odzwierciedlenie w różnych stężeniach h.p.w. w perfuzatach. Rozumowanie takie mogło również częściowo sugerować nasze poprzednie badania doświadczalne, w których stosując identyczny układ doświadczalny, opierając się na teście eliminacji z płynu perfundującego amidopiryny, wykazano wyraźny indukujący wpływ na wątrobę szczurów fenobarbitalu, enkortonu i obydwu leków stosowanych równocześnie (1). Wykonane obecnie badania przypuszczenia te potwierdziły tylko częściowo. U szczurów zdrowych jedynie fenobarbital podawany zwierzętom przed perfuzją powodował znamienny wzrost stężenia h.p.w. w perfuzatach, natomiast sam enkorton i enkorton stosowany równocześnie z fenobarbitalem takiego działania nie wykazywał. Ponadto fenobarbital stosowany równocześnie z enkortonem prawdopodobnie na skutek interakcji na poziomie metabolicznym nie wpływał na zmianę stężenia h.p.w. w perfuzatach, tak jak w grupie szczurów otrzymujących tylko enkorton bez fenobarbitalu. Ocena mikroskopowa wątroby szczurów wybranych losowo z każdej z grup doświadczalnych cz. I b. nie wykazała żadnych widocznych zmian patologicznych. A zatem stwierdzany wpływ fenobarbitalu na wzrost stężenia h.p.w. w perfuzatach winien być tłumaczony inaczej, np. bezpośrednim wpływem na jej syntezę w wątrobie tych zwierząt, które go otrzymywały. W preparatach mikroskopowych szczurów cz. II b. stwierdzono wyraźne zmiany morfologiczne, polegające z jednej strony na zmianach wstecznych komórek wątrobowych, a z drugiej — na wytworzeniu zrębu. Ponieważ we wszystkich ocenianych preparatach histologicznych zmiany były jednakowe, można przyjąć, że rodzaj i zakres toksycznego działania  $CCl_4$  na wątrobę zwierząt cz. II b. był taki sam, a stosowane przed perfuzją induktory enzymatyczne nie nasilały tych zmian ani nie hamowały ich rozwoju. Stężenie h.p.w. w perfuzatach wątroby szczurów cz. II b. było wyższe niż u szczurów z nie uszkodzoną wątrobą, co pokrywa się pośrednio z cytowanymi doniesieniami klinicznymi, w których stwierdzono, że wówczas, gdy w wątrobie dochodzi do aktywnej fibrogenezy, poziom hydroksyproliny i proliny w moczu i we krwi wzrasta (2, 5, 7, 9). W przeprowadzonych badaniach nie potwierdzono zakładanego wpływu stosowanych przed perfuzją induktorów na stężenie h.p.w. w perfuzatach wątroby szczurów cz. II b. W trzech grupach doświadczalnych, w których podawano zwierzętom induktory enzymatyczne, stężenie h.p.w. w preparatach nie różniło się w sposób istotny od wyników uzyskanych w grupie kontrolnej IIA, w której nie stosowano żadnych leków. Interpretacja uzyskanych wyników jest trudna i na obecnym etapie badań może być tylko hipotetyczna. Albo stosowane w doświadczeniu induktory enzymatyczne nie wywierały zakładanego, indukującego działania na hydroksylazę proliny kolagenu, a stwierdzany

po fenobarbitalu wzrost stężenia h.p.w. w perfuzatach szczurów zdrowych był następstwem innego zupełnie mechanizmu działania leku, albo też właśnie indukujące działanie wykazywał tylko fenobarbital i to wyłącznie na wątrobę nie uszkodzoną. Ostateczne wyjaśnienie takiego założenia nie jest obecnie możliwe. Wymaga to obserwacji większego materiału doświadczalnego z zastosowaniem różnych dawek, rodzajów i czasu stosowania induktorów enzymatycznych oraz oceny histoenzymatycznej tkanki wątrobowej badanych zwierząt.

### Wnioski

1. Perfuzja izolowanej wątroby szczurów i ocena stężenia h.p.w. w płynie perfundującym jest przydatnym modelem doświadczalnym w badaniach nad dynamiką fibrogenyzy w wątrobie.

2. Fenobarbital podawany przed perfuzją szczurom zdrowym powoduje wyraźny wzrost stężenia h.p.w. w płynie perfundującym.

3. U zdrowych szczurów po stosowaniu enkortonu i enkortonu z fenobarbitalem stężenie h.p.w. w płynie perfundującym nie zmienia się.

4. Stężenie h.p.w. w płynie perfundującym jest wyższe u szczurów z uszkodzoną przez  $\text{CCl}_4$  wątrobą niż u szczurów z nie uszkodzoną wątrobą.

5. Fenobarbital, enkorton oraz enkorton stosowany równocześnie z fenobarbitalem nie wpływają na zmiany stężenia h.p.w. w płynie perfundującym wątrobę uszkodzoną przewlekłym stosowaniem  $\text{CCl}_4$ .

### PIŚMIENNICTWO

1. Czarnecki J. i wsp.: Krzywa eliminacji amidopiryny (Aminophenazone) jako wskaźnik indukcji enzymatycznej siateczki endoplazmatycznej perfundowanej wątroby szczurów. *Pol. Tyg. Lek.* **34**, 125, 1978.
2. Feinman L., Leiber C. S.: Hepatic Collagen Metabolism, Effect of Alcohol Consumption in Rats and Baboons. *Science (N.Y.)* **176**, 795, 1972.
3. Grant M. E., Prockop D. J.: The Biosynthesis of Collagen. *New Engl. J. Med.* **286**, 194, 1972.
4. Grzywa M. i wsp.: Wpływ propranololu na wydalanie hydroksyproliny z moczem u chorych z nadczynnością tarczycy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **62**, 23, 1979.
5. Hanzlik J.: Badania nad składem chemicznym ściany naczyniowej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 771, 1965.
6. Hanzlik J. i wsp.: Hydroksyprolina we krwi i w moczu chorych na wirusowe zapalenie wątroby. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **40**, 237, 1978.
7. Jasłowski J., Jarmuszcak Z.: Poziom proliny w surowicy i wydzielenie hydroksyproliny z moczem w przewlekłych chorobach wątroby. *Materiały 50 Posiedz. Nauk. Pol. Tow. Gastroenterol. Szczecin 1982.*

8. Kuś S.: Marskość wątroby [w:] Patomorfologia wątroby. PZWL, Warszawa 1973.
9. Mata J. M. i wsp.: Serum Free Proline and Free Hydroksyproline in Patients with Chronic Liver Disease. *Gastroenterology* 68, 1265, 1975.
10. McGee i wsp.: Collagen Proline Hydroxylase Activity and <sup>35</sup>S Sulphate Uptake in Human Liver Biopsies. *Gut*. 15, 260, 1974.
11. Miller L. L.: Technique of Isolated Rat Liver Perfusion [w:] Isolated Liver Perfusion and Its Applications (red. I. Bartosek i wsp.). Raven Press, New York 1973.
12. Popper H., Udenfiens S.: Hepatic Fibrosis, Correlation of Biochemical and Morphologic Investigations. *Amer. J. Med.* 49, 707, 1970.
13. Tomaszewski J., Hanzlik J.: Oznaczanie hydroksyproliny w surowicy krwi. *Diagn. Lab.* 7, 183, 1971.

Otrzymano 30 VII 1984. i

### РЕЗЮМЕ

Определялся свободный гидроксипролин (h.p.w.) в перфузирующем растворе изолированной печени 40 здоровых крыс, печень которых поражалась длительным внутривентральным введением  $CCl_4$ . Применяя исследуемым животным индуцированный биокатализатор: фенобарбитал, энкортон с фенобарбиталом определялось их влияние на насыщенность (h.p.w.) в перфузийных растворах. Констатировано большую пригодность модели изолированной перфузии печени крыс для проводимых исследований. Подтверждено, что насыщенность (h.p.w.) в перфузийных растворах у крыс с поврежденной печенью значительно выше, чем у животных с неповрежденной печенью. У здоровых крыс только после применения фенобарбитала наблюдалось значительное увеличение насыщенности (h.p.w.) в перфузирующих растворах. Однако, у животных с поврежденной печенью применение лекарств перед перфузией, не имело никакого влияния на насыщенность (h.p.w.) в перфузатах.

### SUMMARY

Free hydroxyproline (h.p.w.) has been determined in the liquid penetrating the isolated livers of 40 healthy rats and 40 rats whose livers were injured with the lasting intoxication with  $CCl_4$  to the peritoneum. For the examined animals the following inductors were used: fenobarbital, encorton with fenobarbital; their influence on h.p.w. concentration in the perfusates was estimated. There was shown the great usefulness of the model of perfusion of the isolated livers of the rats for the carried out experimental investigations. It was stated that the concentration of h.p.w. in perfusates of the rats with injured liver is significantly higher than that in the rats with the liver which is not injured. In the healthy rats only after application of fenobarbital there was observed a distinct increase of h.p.w. concentration in the penetrating liquid. On the other hand, in the rats with the injured liver the drugs applied before the perfusion had no influence on h.p.w. concentration in the perfusates.

