

Anna CHODKOWSKA

**Wpływ azatiopryny (imuranu)
na indukowaną fenobarbitem eliminację amidopiryny
przez uszkodzoną czterochlorkiem węgla izolowaną wątrobę szczura ***

Влияние азатиоприна на индуцированное фенобарбиталом выделение амидопирина поврежденной четырехлористым углеродом изолированной печенью крыс

The Influence of Azathioprine (Imuran) on the Induced by Phenobarbital Amidopyrine Elimination through the Isolated Rat Liver Damaged with Carbon Tetrachloride

Interakcja, czyli wzajemne oddziaływanie leków, ma miejsce w przypadku równoczesnego stosowania dwu lub więcej leków. W wyniku interakcji może dochodzić do zwiększenia lub osłabienia siły działania stosowanych leków, co ma istotne znaczenie dla prawidłowej terapii i stanowi aktualnie przedmiot szerokiego zainteresowania (1, 6, 12, 14, 22). Interakcja może przebiegać w fazie farmakokinetycznej lub farmakodynamicznej. Faza farmakokinetyczna obejmuje wzajemne oddziaływanie leków w procesie wchłaniania, transportu, dystrybucji i biotransformacji.

Proces biotransformacji leków odbywa się głównie w siateczce endoplazmatycznej komórek wątrobowych za pośrednictwem enzymów mikrosomalnych. Dokładniejsze poznanie niektórych enzymów siateczki stworzyło pewne na razie skromne możliwości sterowania nimi w zakresie hamowania lub zwiększania ich aktywności. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość stymulowania aktywności enzymów mikrosomalnych i przyspieszania procesów biotransformacji. Zjawisko to określane jest nazwą indukcji enzymatycznej (7, 16, 19). Jednym z bardziej poznanych induktorów enzymatycznych są pochodne kwasu barbiturowego, a zwłaszcza fenobarbital (9, 10).

Spośród leków stosowanych w leczeniu przewlekłych zapaleń wątroby wymienić można między innymi azatioprynę, czyli imuran. Imuran należy do grupy antymetabolitów puryn i wywiera działanie immunosupresyjne i cytostatyczne (8, 11). Wpływ imuranu na komórki wątrobowe nie został dokładnie sprecyzowany. Z jednej strony zaleca się jego stosowanie w przewlekłym agresywnym zapaleniu wątroby, a z drugiej istnieją sugestie co do jego hepatotoksycznego działania, które zależy od

* Fragment pracy doktorskiej.

dawki, okresu stosowania oraz od pierwotnego stanu morfologicznego hepatocytów (3).

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu imuranu na indukujące działanie luminalu, nasilające eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczura poddaną toksycznemu działaniu CCl_4 .

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na białych szczurach samcach szczepu Wistar, o masie ciała od 250 do 270 g. Zwierzęta podzielono na V grup, które różniły się między sobą okresem stosowania leków, jak również ilością iniekcji czterochlorku węgla. Z każdej grupy wyodrębniono podgrupę oznaczoną symbolem „a”, która otrzymywała płyn Ringera w ilości 1 ml płynu na 100 g masy ciała. Podgrupa ta stanowiła grupę kontrolną dla każdej badanej grupy. Następnie ze względu na stosowane leki każdą grupę podzielono na dalsze podgrupy oznaczone symbolami „b”, „c”, „d” (tab. 1).

Badane leki, jak również płyn Ringera podawano zwierzętom dootrzewnowo 3 razy w ciągu tygodnia. Fenobarbital (Luminalum Natrium, Polfa) był podawany w dawce $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, imuran (Azathioprine, Polfa) w dawce $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, czterochlorek węgla (POCH Gliwice) podawano 1 raz tygodniowo dootrzewnowo w ilości 0,1 ml. Przez cały czas doświadczenia zwierzęta przebywały w jednakowych warunkach, otrzymywały jednakowe standardowe pożywienie i wodę *ad libitum*. Po zakończeniu doświadczenia wątroby szczurów każdej grupy doświadczalnej izolowano wg metody Millera (18) w modyfikacji Hafta.

Przed rozpoczęciem perfuzji do płynu perfundującego dodawano roztwór amidopiryny w takiej ilości, aby jej stężenie wynosiło $30 \mu\text{g/ml}$ perfuzatu. Po 15-minutowym okresie adaptacji perfuzję prowadzono przez okres 2 godzin. Stężenie amidopiryny w płynie perfundującym oznaczano wg metody Reinicke (20) trzykrotnie, tj. przed oraz po 1 i 2 godz. Stężenie amidopiryny odczytywano z krzywej wzorcowej dla roztworów o znanym stężeniu leku. Wyniki opracowano statystycznie przy zastosowaniu testu t-Studenta (17).

WYNIKI

Stężenie wyjściowe amidopiryny w płynie perfundującym przed perfuzją było we wszystkich grupach doświadczalnych jednakowe i wynosiło $30 \mu\text{g/ml}$. W pierwszym tygodniu podawania czterochlorku węgla zwierzętom grupy Ib średnie wartości stężeń amidopiryny w perfuzatach zarówno po pierwszej, jak i drugiej godzinie okazały się statystycznie nieznamienne w porównaniu z grupą zwierząt otrzymujących tylko płyn Ringera (tab. 2). Począwszy od 2 tygodnia stosowania czterochlorku węgla aż do 15 tygodnia stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie eliminacji amidopiryny (tab. 3, 4, 5, 6). W grupach Ic i IIc, w których zatrute czterochlorkiem węgla zwierzęta otrzymywały dodatkowo fenobarbital, nie wykazano żadnych statystycznie istotnych zmian w średnich

Tab. 1. Schemat przebiegu doświadczenia
Scheme of experiment

Okres stosowania leków	Gru- pa	n	Podgrupy			
			a	b	c	d
			Stosowano			
1 tydzień	I	4× 8	3× tyg. pl. Ringera	1 iniekcja CCl ₄ 0,1 ml/szczura 3× tyg. pl. Ringera (1 ml/100 g)	1 iniekcja CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital (5 mg/kg)	1 iniekcja CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital 3× tyg. imuran (2 mg/kg)
2 tydzień	II	4× 8	3× tyg. pl. Ringera	2 iniekcje CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera	2 iniekcje CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital	2 iniekcje CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital 3× tyg. imuran
5 tydzień	III	4× 8	3× tyg. pl. Ringera	5 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera	5 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital	5 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital 3× tyg. imuran
10 tydzień	IV	4× 8	3× tyg. pl. Ringera	10 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera	10 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital	10 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital 3× tyg. imuran
15 tydzień	V	4× 8	3× tyg. pl. Ringera	15 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera	15 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital	15 iniekcji CCl ₄ 3× tyg. pl. Ringera 3× tyg. fenobarbital 3× tyg. imuran

Tab. 2. Wpływ imuranu i fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu jednorazowej iniekcji CCl_4
Influence of azathioprine and phenobarbital on the elimination of amidopyrine by the isolated rats liver pretreated once with CCl_4

Pod-grupa	Stosowano	Stężenie amidopiryny w $\mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$)		
		przed	po 1 godz.	po 2 godz.
a	plyn Ringera	30 ± 0	$22,77 \pm 0,69$	$18,1 \pm 0,96$
b	CCl_4 , plyn Ringera	30 ± 0	$20,98 \pm 1,02$	$16,9 \pm 0,89$
c	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital	30 ± 0	$19,87 \pm 0,56$	$16,65 \pm 0,64$
d	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital, imuran	30 ± 0	$19,81 \pm 0,67$	$16,5 \pm 0,89$

n=8.

Tab. 3. Wpływ imuranu i fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu 2-krotnym iniekcjom CCl_4
Influence of azathioprine and phenobarbital on the elimination of amidopyrine by the isolated rats liver pretreated twice with CCl_4

Pod-grupa	Stosowano	Stężenie amidopiryny w $\mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$)		
		przed	po 1 godz.	po 2 godz.
a	plyn Ringera	30 ± 0	$22,77 \pm 0,69$	$18,1 \pm 0,96$
b	CCl_4 , plyn Ringera	30 ± 0	$27,01 \pm 0,64^*$	$23,47 \pm 0,71^*$
c	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital	30 ± 0	$25,52 \pm 0,63$	$21,88 \pm 0,54$
d	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital, imuran	30 ± 0	$21,1 \pm 0,59^{*+}$	$16,52 \pm 0,84^{*+}$

n=8; * — $p < 0,001$ w porównaniu z d; ° — $p < 0,05$ w porównaniu z b; + — $p < 0,05$ w porównaniu z c.

Tab. 4. Wpływ imuranu i fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu 5-krotnym iniekcjom CCl_4
Influence of azathioprine and phenobarbital on the elimination of amidopyrine by the isolated rats liver pretreated five times with CCl_4

Pod-grupa	Stosowano	Stężenie amidopiryny w $\mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$)		
		przed	po 1 godz.	po 2 godz.
a	plyn Ringera	30 ± 0	$22,77 \pm 0,69$	$18,1 \pm 0,96$
b	CCl_4 , plyn Ringera	30 ± 0	$27,25 \pm 0,73^*$	$23,96 \pm 0,74^*$
c	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital	30 ± 0	$24,88 \pm 0,72^\circ$	$17,98 \pm 0,57^\circ$
d	CCl_4 , plyn Ringera, fenobarbital, imuran	30 ± 0	$20,52 \pm 0,33^{*+}$	$14,83 \pm 0,43^+$

n=8; * — $p < 0,001$ w porównaniu z d; ° — $p < 0,05$ w porównaniu z b; + — $p < 0,05$ w porównaniu z c.

stężeniach amidopiryny zarówno po pierwszej, jak i drugiej godzinie perfuzji (tab. 2, 3). W grupie IIIC, w której podawano związki przez okres 5 tygodni, fenobarbital przyspieszał statystycznie istotnie eliminację amidopiryny (tab. 4). Podobne efekty uzyskano w grupie IVc, w której statystycznie istotne zwiększenie eliminacji amidopiryny obserwowano po pierwszej godzinie perfuzji (tab. 5). Łączne stosowanie imuranu i fenobarbitalu powodowało zwiększoną eliminację amidopiryny z perfuzatów wątroby w porównaniu z grupami otrzymującymi czterochlorek węgla i płyn Ringera. Statystycznie istotne zmiany stwierdzono od 2 tygodnia podawania i utrzymywały się one aż do 15 tygodnia podawania leków (tab. 3, 4, 5, 6).

W celu wykazania ewentualnego działania indukującego imuranu porównywano podgrupy d z podgrupami c otrzymującymi CCL₄, płyn Ringera i fenobarbital. W grupach IIId, IIId, IVd stwierdzono statystycznie znamieny wzrost eliminacji amidopiryny (tab. 3, 4, 5).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stosowanie badanych leków przez okres jednego tygodnia nie powoduje istotnych zmian w eliminacji amidopiryny przez izolowaną wątrobę. Sugerować to może, że jednorazowa dawka czterochlorku węgla nie uszkadza w sposób istotny funkcji wątroby dotyczącej metabolizmu amidopiryny. Natomiast dwutygodniowe działanie czterochlorku węgla powoduje istotne zmniejszenie eliminacji amidopiryny z perfuzatów wątroby. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (15, 21, 23). Zaburzenia w eliminacji amidopiryny począwszy od 2 tygodnia aż do końca doświadczenia (tj. do 15 tygodnia) stwierdzono również w pozostałych grupach badanych zwierząt otrzymujących czterochlorek węgla.

Fenobarbital stosowany u zwierząt pozostających 2 tygodnie pod wpływem czterochlorku węgla w zasadzie nie wpływał na eliminację amidopiryny. Natomiast izolowane wątroby szczurów poddanych działaniu tego czynnika toksycznego oraz fenobarbitalu przez okres 5 i 10 tygodni eliminowały amidopirynę podobnie jak izolowane wątroby zwierząt kontrolnych. Podobne wyniki uzyskali również i inni autorzy (2, 4, 5). Ten indukujący wpływ na siateczkę endoplazmatyczną hepatocytów nie wystąpił u zwierząt w 15 tygodniu stosowania czterochlorku węgla. Można stąd przypuszczać, że w tym przypadku, kiedy dochodzi do bardzo znacznego uszkodzenia mięszu wątrobowego indukujący wpływ fenobarbitalu jest niewystarczający do przywrócenia prawidłowej eliminacji amidopiryny. Sugestię tę potwierdzają wyniki badań Czarnackiego (4), który niezależnie od testu eliminacji przeprowadził bardzo dokładne ba-

Tab. 5. Wpływ imuranu i fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu 10-krotnym iniekcjom CCl_4
 Influence of azathioprine and phenobarbital on the elimination of amidopyrine by the isolated rats liver pretreated ten times with CCl_4

Pod-grupa	Stosowano	Stężenie amidopiryny w $\mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$)		
		przed	po 1 godz.	po 2 godz.
a	płyn Ringera	30 $\pm$ 0	22,77 $\pm$ 0,69	18,1 $\pm$ 0,96
b	CCl_4 , płyn Ringera	30 $\pm$ 0	27,73 $\pm$ 0,49	24,48 $\pm$ 0,63
c	CCl_4 , płyn Ringera, fenobarbital	30 $\pm$ 0	26,38 $\pm$ 0,66	23,28 $\pm$ 0,64
d	CCl_4 , płyn Ringera, fenobarbital, imuran	30 $\pm$ 0	22,77 $\pm$ 1,42 ^{o+}	19,45 $\pm$ 1,35 ^{o+}

n=8; * — $p < 0,001$ w porównaniu z a; ° — $p < 0,05$ w porównaniu z b; + — $p < 0,05$ w porównaniu z c.

Tab. 6. Wpływ imuranu i fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu 15-krotnym iniekcjom CCl_4
 Influence of azathioprine and phenobarbital on the elimination of amidopyrine by the isolated rats liver pretreated fifteen times with CCl_4

Pod-grupa	Stosowano	Stężenie amidopiryny w $\mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$)		
		przed	po 1 godz.	po 2 godz.
a	płyn Ringera	30 $\pm$ 0	22,77 $\pm$ 0,69	18,1 $\pm$ 0,96
b	CCl_4 , płyn Ringera	30 $\pm$ 0	27,73 $\pm$ 0,49 ^x	24,48 $\pm$ 0,63 ^x
c	CCl_4 , płyn Ringera, fenobarbital	30 $\pm$ 0	26,38 $\pm$ 0,66	23,28 $\pm$ 0,64
d	CCl_4 , płyn Ringera, fenobarbital, imuran	30 $\pm$ 0	23,67 $\pm$ 1,45 ^o	18,22 $\pm$ 1,82 ^{o+}

n=8; * — $p < 0,001$ w porównaniu z a; ° — $p < 0,05$ w porównaniu z b; + — $p < 0,05$ w porównaniu z c.

dania morfologiczne, m. in. z użyciem mikroskopu elektronowego. Imuran stosowany w okresie od 2 do 15 tygodnia doświadczenia nasilał wyraźnie indukujący wpływ fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu czterochloru węgla.

Można przyjąć, że uzyskany efekt jest wynikiem interakcji fenobarbitalu i imuranu, w wyniku której siateczka endoplazmatyczna hepatocytów eliminuje amidopirynę na poziomie prawidłowym. Jest to szczególnie interesujące w przypadku zwierząt pozostających przez 15 tygodni pod wpływem czterochloru węgla, gdyż w tym czasie występują w wątrobie zmiany zanikowe, a sam fenobarbital nie wpływa na eliminację amidopiryny. Dodatkowe zastosowanie imuranu powoduje istotnie zwiększenie aktywności enzymatycznej komórek wątrobowych i w końcowym

efekcie prowadzi do normalizacji jej funkcji. Wprawdzie przeprowadzone badania i sformułowane na ich podstawie wnioski mogą być odnoszone tylko do zwierząt użytych w stosowanym układzie doświadczalnym, niemniej jednak przypuszczać można, że podobne indukujące działanie imuranu występować może i u ludzi.

WNIOSKI

1. Funkcja metaboliczna izolowanej wątroby określona testem eliminacji amidopiryny zostaje wyraźnie zaburzona począwszy od 2 tygodnia stosowania czterochlorku węgla.

2. Fenobarbital indukuje siateczkę endoplazmatyczną hepatocytów i powoduje normalizację eliminacji amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczura w okresie od 5 do 10 tygodnia stosowania czterochlorku węgla.

3. Imuran wyraźnie nasila indukujący wpływ fenobarbitalu na eliminację amidopiryny przez izolowaną wątrobę szczurów poddanych działaniu czterochlorku węgla.

PIŚMIENNICTWO

1. Andreassen B.: Interaction between antipyrine and the microsomal ethanol oxidation in rat liver. *Pharmacology* **12**, 24, 1974.
2. Andreassen B.: Liver failure and drug metabolism. *Scand. J. Gastroent.* **10**, 293, 1975.
3. Beyc H. P. A.: Azathioprine treatment in active chronic hepatitis. An evaluation of the therapeutic dose levels. *Scand. J. Gastroenterol. supp.* 16/19, 1972.
4. Czarnecki J.: Badania doświadczalne nad interakcją leków i indukcją enzymatyczną wątroby zdrowych szczurów i szczurów po przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla. Rozprawa habilitacyjna. Lublin 1978.
5. Czarnecki P., Pokora J., Chodkowska A., Radwan P., Gieroba J.: Krzywa eliminacji amidopiryny jako wskaźnik indukcji enzymatycznej siateczki endoplazmatycznej perfundowanej wątroby szczurów. *Pol. Tyg. Lek.* **24**, 125, 1979.
6. Drzewiecki J.: Wydalanie kwasu D-glutarowego i metabolizm salicylamidu u ludzi pod wpływem indukcji enzymatycznej wywołanej fenobarbitem. Praca doktorska. Śl. Akad. Med. Katowice 1974.
7. Górski M.: Niektóre problemy przewlekłego zapalenia wątroby. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **49**, 1, 1972.
8. Górski M.: Ocena zespołowa immunosupresyjnego leczenia przewlekłego aktywnego zapalenia wątroby. *Pol. Tyg. Lek.* **30**, 109, 1975.
9. Gregotti C.: Effects of phenobarbital on the hepatic microsome metabolism of erythromycin in rats. *Boll. Soc. Ita. Biol. Sper.* **52**, 1939, 1976.
10. Hahn H. K.: Phenobarbital induced enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 164, 1977.

11. Heathcote J.: A prospective controlled trial of azathioprine in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **70**, 656, 1976.
12. Hepner G. W.: Breath analysis in assessment of liver function. *Lancet*, **2**, 370, 1975.
13. Joannides C. A.: Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolising enzymes by a series of barbiturates. *J. Pharm. Pharmacol.* **27**, 739, 1976.
14. Kokot F.: Wpływ leczenia fenobarbitalem i/lub hydantoinalem na aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy surowicy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **57**, 475, 1977.
15. Kroener H.: The significance of intracellular calcium in rat liver cell damage by carbon tetrachloride. *Beitr. Pathol.* **160**, 245, 1977.
16. Krotkiewicz A.: Interakcja leków stosowanych w kardiologii. *Terapia i leki*, **26**, 269, 1976.
17. Luszczewicz A.: Metody wnioskowania statystycznego. PWN, Warszawa 1973.
18. Miller L. L.: Technique of isolated liver perfusion. Chapt. 1 p. 11 in "Isolated liver perfusion and its applications". Edit. Bartosek I. Guaitani A. Ravena-Press—New York 1973.
19. Mrozikiewicz A.: Interakcja leków. *Akad. Med. Poznań* 1974.
20. Reinicke C.: Quantitative determination of aminophenazone in human whole blood. *Pharmazie* **24**, 606, 1969.
21. Szlamka I., Menyhart J., Samogyi J.: Relation between lysosomal damage, fatty infiltration, and hepatocellular necrosis in the course of acute liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **46**, 51, 1975.
22. Szreniawski Z.: Mechanizmy dynamiczne wzajemnego oddziaływania leków. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **57**, 449, 1977.
23. Villarruel M., De Toranzo E. G. D., Castro J. A.: Carbon tetrachloride activation lipid peroxidation and the mixed function oxygenase activity of various rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 337, 1977.

Wpł. 3 XI 1982 r.

РЕЗЮМЕ

Проведенные на крысах исследования показали, что имуран повышает индуцированное влияние фенобарбитала на выделение амидопирина изолированной печени животных, подвергнутых действию четыреххлористым углеродом. Эти эффекты выступают на протяжении 2—15 недель применения четыреххлористого углерода и исследованных средств.

SUMMARY

Male Wistar rats were injected with carbon tetrachloride once weekly from 2 to 15 weeks. It was shown that in CCl_4 pretreated animals imuran enhanced the inductive effect of phenobarbital upon the isolated liver elimination rate of amido-pyrine. The observed phenomenon was dependent on the time of administration of CCl_4 and reached its maximum after 15 weeks.