

# PATOLOGIA I TERAPIA

ZENON TOMICKI, ALEKSANRA MALINOWSKA

## Próba bromsulftaleinowa — (BSF clearance) w motylicy wątrobowej u bydła

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych Wydz. Wet. w Warszawie  
Kierownik: doc. dr FELIKS NAGÓRSKIZ Zakładu Chemii Fizjologicznej Wydz. Wet. w Warszawie  
Kierownik: doc. dr STEFAN NYREK

W diagnostyce klinicznej stosuje się wiele prób w celu określenia stanu czynnościowego wątroby. Wyniki tych metod wskazują na stan patologiczny na ogół dopiero wówczas, gdy uszkodzenie narządu jest znaczne. Żadna jednak z najczęściej stosowanych metod nie informuje w sposób dostateczny o stopniu uszkodzenia wątroby, zwłaszcza w tych przypadkach, gdy powstałe zmiany nie są zbyt wyraźne.

Za najbardziej czułą uznawana jest dotychczas próba obciążenia wątroby bromsulftaleiną, opisana w 1925 r. przez *Rosenthala* i *Whitea* (9). Bromsulftaleina wstrzyknięta dożylnie jest prawie całkowicie wychwytywana przez zdrowe komórki wątroby i wydzielana do żółci w stanie chemicznie nie zmienionym. Niewielkie nawet zaburzenia czynności wątroby, powodują zmniejszenie wydzielania barwnika i zatrzymanie jego w krwi. Dla zbadania stopnia wydzielania pobiera się w określonych odstępach czasu próbki krwi i oznacza stężenie bromsulftaleiny w osoczu na podstawie reakcji barwnej. Ponieważ na wydzielanie bromsulftaleiny nie wpływają czynniki pozawątrobowe, próba ta jest uważana za swoistą w diagnostyce schorzeń wątroby. Metoda *Rosenthala* i *Whitea* została szczegółowo opracowana w 1952 r. przez *Goodmana* (4) i zastosowana w diagnostyce klinicznej jako „clearance BSF”. Clearance BSF, inaczej oczyszczanie wątrobowe, oznacza ilość osocza w ml, oczyszczonego z bromsulftaleiny przez wątrobę w czasie 1 min. Ponieważ podczas badania czynności wątroby pomiary stężenia bromsulftaleiny w żółci są praktycznie niemożliwe, wyliczenia współczynnika oczyszczania dokonuje się drogą pośrednią, na podstawie zmian stężenia w osoczu.

W diagnostyce weterynaryjnej „clearance BSF” u zwierząt dużych był stosowany przez *Vardimana* (10), a następnie przez *Corneliusa* (1, 2). Dużym zwierzętom podano 1 g bromsulftaleiny dożylnie, niezależnie od ciężaru ich ciała, po czym w określonych odstępach czasu pobierano próbki krwi. Do wykonania obliczeń potrzeba co najmniej dwóch pomiarów stężenia barwnika w osoczu, oznaczonych w pewnym znanym odstępie czasu. Ponieważ próba bromsulftaleinowa nie była dotychczas stosowana w rozpoznawaniu stanu funkcjonalnego wątroby zwierząt dotkniętych motylicą, fakt ten skłonił autorów do podjęcia tych badań. Motylicy

wątrobową u przeżuwaczy jest bardzo rozpowszechniona. Ze względu na straty, które przynosi gospodarce hodowlanej, stała się przedmiotem zainteresowania zarówno parazytologów jak i klinicystów. Zmiany uszkodzeniowe w wątrobie, wywołane wędrowką larw motylicy, wywierają wpływ na jej czynność. Dotychczas stosowane w diagnostyce weterynaryjnej próby czynnościowe nie są wystarczająco czułe do wykrywania stopnia uszkodzenia wątroby.

### Badania własne.

**Metodyka.** Próbę bromsulftaleinową wykonywano według metody stosowanej przez *Corneliusa*. Każdej krowie na czczo, wstrzykiwano do żyły jarzmowej 1 g bromsulftaleiny w 5% roztworze wodnym, a następnie pobierano próbki krwi ściśle po 5 i 30 minutach. Jako środek przeciwkrzepliwý, stosowano heparynę. Po odwirowaniu krwinek, pobierano z każdej próbki 2 ml osocza, do którego dodawano 1 ml wody, oraz 3 ml 0,1 N NaOH. Powstałe zmiany zabarwienia porównywano z próbkami kontrolnymi, które były przygotowane w ten sam sposób, jak i poprzednie, z tą tylko różnicą, że zamiast ługu sodowego dodawano 0,1 N HCl. Pomiarów dokonywano na elektrofotokolorymetrze *Lange'go*. Krzywą wykreślano na podstawie pomiarów roztworów standardowych.

W metodzie posługiwano się wzorami, podanymi przez *Corneliusa*, według których dokonywano obliczeń. Poniżej przedstawiono najważniejsze z nich, z pominięciem wyprowadzenia.

Początkowe stężenie barwnika w mg % oznaczono — P, stężenie barwnika w próbce pobranej w 5 min. po wstrzyknięciu (w czasie  $t_1$ ) —  $P_1$  a po 30 min. (w czasie  $t_2$ ) —  $P_2$ , k — współczynnik oczyszczania.

$$k \text{ BSF} = \frac{\log P_1 - \log P_2}{t_1 - t_2}$$

Mnożąc współczynnik oczyszczania, przez stałą liczbę 2,3 (*Cornelius*), otrzymujemy wartość cząstkową — K (fractional clearance), która służy do wyliczenia clearance — C. V — oznacza objętość osocza, w którym jest rozpuszczona cała ilość barwnika.

$$K = 2,3 \times k$$

$$K = \frac{C}{V} \text{ albo } C = K \times V$$

Niektórzy autorzy (*Nowak*, 7) uważają, że raczej należy posługiwać się współczynnikami oczyszczania, ponieważ dla wyliczenia wartości oczyszczania wątrobowego potrzebna jest objętość osocza w organizmie, która może się zmieniać w zależności od różnych warunków.

Badając oczyszczanie wątrobowe u dużych zwierząt, *Cornelius* posługiwał się wartością  $t_{1/2}$  — „czas półtrwania”. Jest to czas, w którym stężenie barwnika w osoczu będzie równe połowie stężenia początkowego — P.

$$t_{1/2} = \frac{\log 2}{K}$$

Ponieważ  $\log 2 = 0,692$

$$t_{1/2} = \frac{0,692}{K}$$

Posługując się przedstawionymi wzorami dla każdego badanego zwierzęcia wyliczona została wartość cząstkowa —  $K$ , clearance —  $C$ , oraz czas półtrwania —  $t_{1/2}$ . Sposób obliczania jest podany na przykładzie krowy nr 5, z grupy zdrowych. Masa ciała = 510 kg, objętość osocza  $V = 18,666$  l. Wartość  $V$  została wyliczona na podstawie danych, uzyskanych przez Turner'a i Herman'a (cyt. wg Dukesa'a (3), którzy ustalili objętość krwi i osocza niektórych zwierząt metodą barwnikową.

$$P_1 = 3 \text{ mg } \%$$

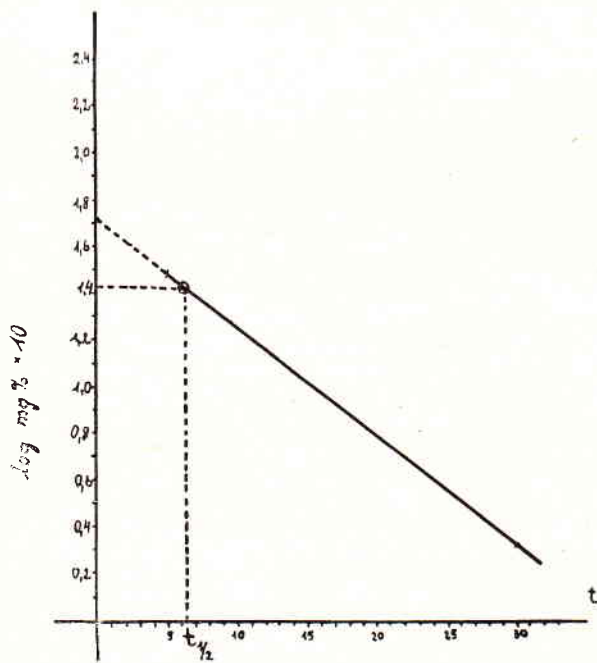
$$P_2 = 0,2 \text{ mg } \%$$

$$K = 2,3 \times \frac{1,1761}{25} = 0,108$$

$$C = 0,108 \times 18,666 = 2,016 \text{ l./min.}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,692}{0,108} = 6,4 \text{ min.}$$

Przedstawione powyżej wyliczenia można zilustrować graficznie na papierze półlogarytmicznym. Na rzędnej oznacza się logarytm stężenia bromsulfaleiny (w  $\text{mg } \%$   $\times 10$ ), na odciętej czas ( $t$ ) w min. Uzyskana krzywa ilustruje wartości dla  $K$ . Przez ekstrapolację krzywej do  $t = 0$ , można wyznaczyć stężenie początkowe barwnika, z czego dalej możemy wyliczyć wartość  $V$ . Znając stężenie początkowe barwnika, posługując się wykresem, można wyznaczyć wartość  $t_{1/2}$ . Na osi rzędnej oznaczamy punkt, odpowiadający logarytmowi połowy wartości początkowego stężenia (w  $\text{mg } \%$   $\times 10$ ) barwnika. Na tej samej wysokości zaznaczamy punkt na krzywej  $k$ . Odnajdujemy jego odpowiednik na osi  $t$ . Będzie to wartość  $t_{1/2}$  w min.



Wykres 1. Przebieg wydalania bromsulfaleiny z krwi u krowy zdrowej, na podstawie stężenia bromsulfaleiny w próbach po 5 i 30 min. od chwili wstrzyknięcia. Linia przerywana wyznacza na osi  $t$  wartość  $t_{0,5}$ .

Równoległe z określaniem stanu czynnościowego wątroby wykonano inne badania, a mianowicie:

a) Oznaczanie ilościowe białka całkowitego surowicy metodą refraktometryczną za pomocą aparatu Abbe'go.  
b) Badanie frakcji białkowych metodą elektroforezy bibulowej (bufor weronalowy o pH 8,6, siła jonowej 0,15, przy napięciu 240 V i natężeniu 0,5 mA (cm szer. paska, czas rozdzielu 8 godz., wymiar pasków 30 cm  $\times$  3 cm).

c) Oznaczanie ilościowe bilirubiny metodą Van den Bergh'a.

d) Oznaczanie reszty azotowej — RN metodą Rapaporta-Eichhorna.

## Wyniki.

Badania przeprowadzono na 50 krowach. Po uboju dokonano oględzin sekcyjnych. Ze skrawków wątroby wykonano preparaty histologiczne barwione hematoksyliną — eozyną oraz Sudanem III. Badania kliniczne, wyniki oględzin poubojowych, oraz rozpoznanie histopatologiczne posłużyły do wydzielenia grup.

Grupę kontrolną stanowiło 15 krów zdrowych w wieku 4—6 lat.

Z grupy zwierząt chorych wzięto pod uwagę tylko te sztuki, u których zmiany w wątrobie były spowodowane obecnością motylicy wątrobowej.

Krowy te zostały podzielone na dwie grupy:

I grupa — 12 krów w wieku od 4 do 10 lat, u których w wątrobie stwierdzono wyraźną przewagę świeżych zmian o charakterze zapalnym.

II grupa — 21 krów w wieku od 4 do 10 lat, u których w wątrobie stwierdzono zmiany o charakterze przewlekłym.

Stosując metodę Corneliusa, uzyskano wartości  $K$ ,  $C$  i  $t_{1/2}$ , z których wyliczono średnie arytmetyczne oraz odchylenia standardowe dla poszczególnych grup.

Tabela I

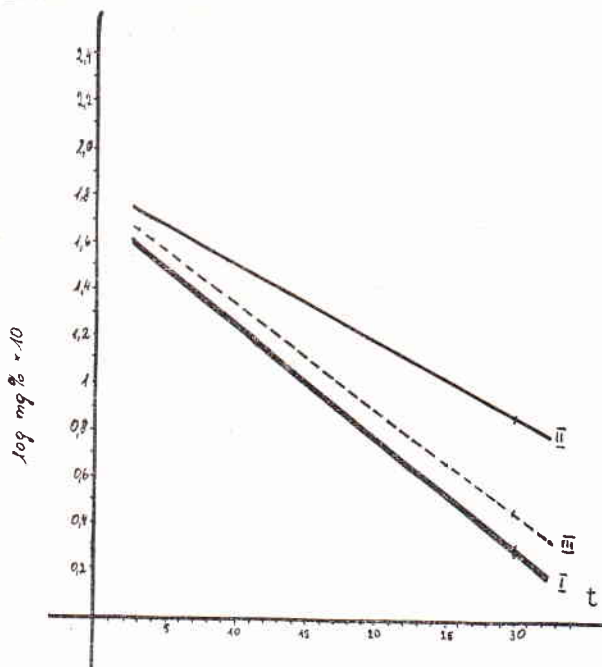
Wskaźniki średnich wartości cząstkowych —  $K$ , clearance —  $C$  i czasu półtrwania —  $t_{1/2}$  dla krów z motylicą wątrobową i krów zdrowych.

Grupy	Krowy ze świeżymi zmianami w wątrobie	Krowy z przewlekłymi zmianami w wątrobie	Krowy kontrolne
$K$ średnia arytm.	0,080	0,110	0,114
Odchylenie stand. $K$	$\pm 0,115$	$\pm 0,00983$	$\pm 0,015$
$C$ w l./min. średnia arytm.	1,255	1,635	1,982
Odchylenie stand. $C$	$\pm 0,239$	$\pm 0,216$	$\pm 0,196$
$t_{1/2}$ w min. średnia arytm.	8,75	6,35	6,09
Odchylenie stand. $t_{1/2}$	$\pm 1,19$	$\pm 0,555$	$\pm 0,794$

Z powyższej tabeli wynika, że istnieją różnice w średnich wartościach dla poszczególnych grup. Szczególnie wyraźna jest różnica wyników dla grupy krów z przewagą świeżych zmian zapalnych w wątrobie, w porównaniu z grupą krów zdrowych. Różnica ta w wartościach  $K$  wynosi 0,034 dla  $C$  — 0,727 1/min, a dla wartości  $t^{1/2}$  — 2,66 min. Biorąc pod uwagę grupę krów z przewlekłymi zmianami w wątrobie w porównaniu z grupą krów zdrowych, różnice wyników są nieznaczne. Krowy ze zmianami przewlekłymi w wątrobie mają wartości  $K$ ,  $C$  i  $t^{1/2}$  nieco wyższe.

Uzyskane dane świadczą o tym, że w przypadku zaistnienia uszkodzenia komórek wątrobowych podczas ostrej inwazji larw, ulegają uszkodzeniu mechanizmy wychwytyjące bromsulftaleinę z krwi. Poziom bromsulftaleiny we krwi, szczególnie w próbie pobranej po 30 min, jest wyższy niż u krów zdrowych, a czas wydzielenia ulega przedłużeniu. W okresie późniejszym nasilenie ostrych zmian w wątrobie ulega osłabieniu i sprawność wątroby powoli powraca do normy. Ubytki uszkodzonego mięszu zostają wypełnione tkanką ziarninową, która ulega zbliznowaceniu, w wyniku czego powstaje marskość wątroby.

Dla zobrazowania występujących różnic w poszczególnych przypadkach został podany wykres na podstawie wyników od trzech krów. Każda z tych krów posiada wartości  $K$ ,  $C$  i  $t^{1/2}$  zbliżone do średnich odpowiednich grup.



Wykres 2. Przebieg wydalania bromsulftaleiny z krwi u krowy ze świeżymi zmianami w wątrobie (II), ze zmianami przewlekłymi (III) oraz u krowy zdrowej (I). Różnice w poszczególnych przypadkach występują najbardziej wyraźnie po 30 min.

Na osi rzędnych oznaczono logarytm  $\text{mg } \%$  bromsulftaleiny  $\times 10$ , na osi odciętych czas  $t$

w min. Krzywe wykreślono na podstawie stężeń bromsulftaleiny w próbach krwi w czasie 5 i 30 min. po wstrzyknięciu.

Przebieg wydzielenia ilustruje wykres.

W tabeli II zostały zamieszczone średnie wartości białka całkowitego, skład procentowy frakcji białkowych, poziom bilirubiny i reszta azotowa dla poszczególnych grup.

Tabela II

Wskaźniki średnich wartości poziomu białka całkowitego, frakcji białkowych, oraz poziomu bilirubiny i reszty azotowej u krów zdrowych i w motylicy wątrobowej.

Grupy		Krowy zdrowe	Krowy ze świeżymi zmianami w wątrobie	Krowy z przewlekłymi zmianami w wątrobie
Ogólny poziom białka w g %		6,57	8,25	7,98
Albuminy wartości wzgl. w g %		41,69	30,30	32,15
Globuliny wartości wzgl. w g %	alfa	12,42	15,46	14,73
	beta	13,10	12,10	13,37
	gamma	33,00	42,00	37,39
Bilirubina w mg %		od 0,125 do 0,250	od 0,125 do 0,250	od 0,125 do 0,250
RN w mg %		21,3	19,5	20,3

Z tabeli wynika, że największe zmiany w grupach zachodzą w zakresie białka całkowitego surowicy i frakcji białkowych, nie stwierdza się natomiast większych wahań wartości bilirubiny i reszty azotowej. W zakresie białka całkowitego surowicy dają się zauważyć pewne gradacje w zależności od stopnia uszkodzenia wątroby. Najwyższy poziom białka występuje u krów ze świeżymi zmianami w wątrobie (8,25 g%), nieco niższą zawartość mamy ze zmianami przewlekłymi (7,98 g%) i wreszcie u krów zdrowych wartości są najniższe (6,57 g%). To zachowanie się białka całkowitego jest związane z przesunięciem frakcji białkowych w kierunku gamma globulin. Występują one w zwiększonej ilości zwłaszcza u krów, u których stwierdzono stan zapalny wątroby, co uzasadnia fakt uszkodzenia wątroby i obniżenia jej czynności. W mniejszym stopniu ulegają zwiększeniu gamma globuliny u krów, u których zmiany w wątrobie mają charakter przewlekły.

Wartości bilirubiny oraz RN we wszystkich grupach pozostają w granicach normy.

## Omówienie wyników i wnioski.

Badania wykazały, że szybkość wydalania bromsulftaleiny z krwi jest uzależniona od nasilenia zmian zapalnych w wątrobie. W przypadkach świeżych szybkość wydalania bromsulftaleiny z krwi jest mniejsza niż w stanach przewlekłych, gdzie proces ten jest zbliżony do warunków normalnych.

Próba bromsulftaleinowa jest zatem czułą metodą badania wydolności wątroby w zależności od stopnia nasilenia zmian zapalnych. Odpowiednim zmianom będą również ulegały białka surowicy.

Można przypuszczać, że w przypadku motylicy wątroby próba bromsulftaleinowa może być czułym wskaźnikiem stopnia uszkodzenia wątroby i jej wydolności. Wynik negatywny próby nie wyklucza natomiast przewlekłych zmian w wątrobie.

Oznaczanie „clearance BSF” w motylicy wątrobowej u bydła posiada znaczenie tylko w niektórych przypadkach, co bynajmniej nie zmniejsza wartości metody, jako dość przystępnego środka do oznaczania sprawności wątroby.

## Piśmiennictwo

1. Cornelius Ch. E., Wheat J. D.: Bromsulphthalein clearance in the Horse — A quantitative liver function test. *Am. Journ. of Vet. Research.* 18, 389, 1957.
2. Cornelius Ch. E., Theilen G. S., Rhode E. A.: Quantitative Assessment of bovine liver function, using the sulfobromophthalein sodium clearance technique. *Am. Journ. of Vet. Research.* 19, 560, 1958.
3. Dukes H. H.: *The physiology of domestic Animals.* New York, 1947.
4. Goodman R. D.: Bromsulphthalein clearance: a quantitative clinical test of liver function. *The Journ. of Lab. and Clin. Med.* 40, 531, 1952.
5. Maggiora L., Bottino D.: Hepatic clearance of bromsulphthalein in the healthy child. *Panminerva Med.* 1, 7, 292, 1955.
6. Marek J., Mocsy J.: *Lehrbuch der klinischen Diagnostik der inneren Krankheiten der Haustiere.* Jena, 1956.
7. Nowak J., Markiewicz M., Smarsz C.: Próba bromsulftaleinowa („BSF clearance”). *Pol. Tyg. Lek.* 43, 1324, 1956.
8. Richards T. G., Tindall V. R., Young A.: A modification of the bromsulphthalein liver function test to predict the dye content of the liver and bile. *Clin. Sci.* 18, 499, 1959.
9. Rosenthal S. M., White E. C.: Clinical application of bromsulphthalein for hepatic function. *J.A.M.A.* 84, 1112, 1925.
10. Vardiman P. H.: The bromsulftalein liver function test and biopsy of the liver in the diagnosis of Senecio poisoning in cattle. *Am. J. Vet. Research* 14, 175, 1953.

Adres autora: Zenon Tomicki, Warszawa 35, Jelonki os. „Przyjaźń”.

## Тотмицки З, Молиновска А. — БРОМСУЛЬФТАЛЕИНОВАЯ ПРОБА B.S.F. CLEARANCE ПРИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ДВУУСТКЕ РОГАТОГО СКОТА.

Авторы применили бромсульфталейновую пробу (B.S.F. clearance), определяя уровень общего белка, процентный состав белковых фракций, уровень билирубина и азотный остаток у 50 коров 4–10 летнего возраста, из которых выделили группу здоровых и группу с изменениями

в печени вызванными печеночной двуусткой. У коров со свежими изменениями в печени установлено замедление выделения бромсульфталейна из крови, повышение уровня общего белка и отклонения в составе отдельных белковых фракций (повышение альфа и гамма глобулин). У коров с хроническими изменениями скорость выделения бромсульфталейна сближалась к норме. Изменения в белковых фракциях сближались к таким же в предыдущей группе, однако в меньшей степени.

## Tomicki Z., Malinowska A. — Bromsulphthalein test — (BSF clearance) in liver fluke in cattle.

The bromsulphthalein test (BSF clearance) was performed, the total protein level was determined and estimated were the percentage of the protein fractions, bilirubin level and nitrogen rest in 50 cows, aged from 4 to 10 years. The cows were arranged in two groups, the first included healthy animals, the second animals with lesions in the liver caused by liver fluke. In cows with fresh lesions in the liver, the rate of excretion of BSF from the blood is diminished. The total protein level is raised and the separate protein fractions appeared unbalanced (increase of alpha and gamma globulins).

In cows with chronic lesions the rate of the excretion of BSF is similar to the normal state. The changes in protein fractions are similar to changes in the previous group, but to a lesser degree.

## Tomicki Z., Malinowska A. — Le test bromsulphthaleinique (BSF-clearance) dans la distomatose hépatique du bétail.

On exécuta le test bromsulphthaleinique (BSF-clearance) on détermina le niveau de l'albumine totale, la composition pourcentaire des fractions protéiniques, le niveau de bilirubine et le restant d'azote chez 50 vaches d'un âge de 4 à 10 ans. On sépara les groupes de vaches bien portantes des groupes d'animaux démontrant des lésions du foie, causées par la distomatose hépatique. Chez les vaches ayant des lésions récentes du foie l'élimination du bromsulphthaleine est ralentie. On constate une élévation du niveau total de protéine, de même qu'un ébranlement dans la composition des fractions protéiniques respectives (élévation des globulines alpha et gamma).

Chez les vaches avec des lésions chroniques, la rapidité d'élimination de la bromsulphthaleine est rapprochée à l'état normal. Les changements dans la sphère des fractions protéiniques sont de même rapprochés à ceux du groupe précédent, mais à un degré moins élevé.

## Tomicki Z., Malinowska A. — BSF — Clearanceprobe in der Leberdistomatose beim Rind.

Bei 50 Kühen im Alter von 4 bis 10 Jahren wurde die BSF — Clearanceprobe, Gesamteiweisspiegel, Prozentsatz der Eiweissfraktionen, Bilirubinspiegel und RN ausgeführt. Die gesunden Kühe und Kühe mit Leberdistomatose wurden abgetrennt. Bei den mit frischen Leberveränderungen behafteten Kühen ist die Geschwindigkeit des Ausscheidens des Bromsulphthaleins vermindert. Dagegen erhöht sich der allgemeine Eiweisspiegel und tritt eine Schwankung in der Zusammensetzung der einzelnen Eiweissfraktionen auf (Zunahme der alpha und gamma Globuline). Bei Kühen mit chronischen Veränderungen ist die Geschwindigkeit des Ausscheidens des Bromsulphthaleins annähernd gleich dem normalen Stand. Die Veränderungen der Eiweissfraktionen nähern sich den Veränderungen der vorherigen Gruppe wenn auch in einem kleineren Grade.