

# Wpływ Vetaheparu na wydzielanie żółci u owiec

RYSZARD BOBOWIEC, JAN GŁUSZAK\*, FRANCO MARTELLI\*\*,  
MARTA WÓJCIK, JOANNA WESSELY-SZPONDER

Zakład Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Vet Agro Lublin Sp z o.o., ul. Gliniana 32, 20-616 Lublin

\*\*Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria Università di Pisa

Bobowiec R., Głuszak J., Martelli F., Wójcik M., Wessely-Szponder J.

## Effect of vetahepar on bile secretion in sheep

### Summary

The effect of Vetahepar (VH) (active ingredient: menbutone), given per os (p.o.) or i.v., on volume and biliary bile salt secretion was investigated on four sheep, which were cannulated for choledochus and duodenum. The dose of VH 20 mg/kg m.c. given p.o. was most effective in the stimulation of bile salts secretion and volume of bile. The choleric effects of VH began 30 minutes after oral administration and peaked at 60 minutes. The augmented volume of bile occurred earlier than the increase in bile salt secretion. Such a response can suggest that the relaxation of the vascular bed in the liver under the influence of VH stimulation anticipates events evoked by bile salt stimulation. Furthermore, a considerably higher response to the same dose of VH has been observed when only 50% of the bile returned to the duodenum. Thus beneficial effects of VH are especially revealed when disturbances in liver functioning occur.

**Keywords:** sheep, vetahepar, bile

Częste stany cholestazy pojawiające się w dysfunkcjach wątroby wymagają szybkiej interwencji terapeutycznej (4, 9, 12). Oprócz naturalnych cholagogów, jakimi są endogenne sole żółciowe (2, 7, 13), trudne do stosowania ze względu na uboczne wpływy w postaci hemolizy i powodowania świądu oraz środków cholinergicznym (5, 6), używa się coraz więcej preparatów pobudzających cholerezę poprzez różne inne mechanizmy (3, 11, 15). Vetahepar (VH) (produkt firmy Vet Agro Lublin) jako 10% roztwór menbutonu (kwas  $\beta$ -(1-metoksy-4-naftoil) propionowy lub kwas genabilowy) używany jest w praktyce weterynaryjnej w celu pobudzenia wydzielania żółci u owiec, krów, kóz i koni przy podawaniu drogą parenteralną. Osiągając terapeutyczne stężenie w osoczu krwi, menbuton obok stymulacji wydzielniczej wątroby, pobudza wydzielanie soku trzustkowego i żołądkowego, a także pośrednio pobudza motorykę jelit, a następnie usuwany jest z organizmu głównie z moczem, żółcią i kałem. W mało poznanym mechanizmie działania tej pochodnej naftalenowej dostrzega się, z jednej strony, bezpośredni wpływ na gruczoły trawienne, z drugiej – pewne pobudzenie cholinergiczne, dające sporadycznie uboczne objawy parasympatyczne (ślinotok, niepokój i osłabienie mięśni przy podawaniu dożylnym). Takie właściwości VH dają możliwość stosowania go drogą doustną zapewniającą szybkie działanie na wątrobę.

Celem przeprowadzonych badań było porównanie znanego działania VH po wprowadzeniu dożylnym z działaniem drogą pokarmową, zapewniającą eliminację ewentualnych efektów ubocznych i utrzymanie pożądanego odpowiedzi cholerycznych. Postanowiono również określić wpływ VH na mechanizm wydzielania żółci zależny od soli żółciowych (8) oraz na wydzielanie żółci w warunkach zmniejszonego jej dopływu do dwunastnicy (imitacja cholestazy).

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 4 kaniulowanych, do przewodu żółciowego i dwunastnicy, dorosłych owcach rasy PON o zbliżonej masie ciała około 50-55 kg. Sztuczny obieg żółci wytworzono chirurgicznie (15) poprzez założenie drenu polietylenowego ( $\varnothing$  5 mm) do przewodu żółciowego wspólnego i kaniuli dwunastniczej, których połączenie przewodem winylowym umożliwiło przepływ żółci do dwunastnicy w okresie między doświadczeniami. Po rozłączeniu i połączeniu zewnętrznego końca drenu żółciowego z kalibrowanym woreczkiem zbierano żółć w warunkach kontrolnych i doświadczalnych, z której niewielką część (około 1 ml) pozostawiano do analiz, resztę zaś, zależnie od układu doświadczalnego (50% lub 100%) wprowadzano przy użyciu pompy perystaltycznej do dwunastnicy w trakcie lub po zakończeniu oznaczeń. W każdym układzie doświadczalnym wydzielanie żółci poprzedzone 24-godzinnym przerwaniem krążenia wątrobowo-jelitowego soli żółciowych połączone z głodzeniem zwierząt, a okre-

ślane w naszych badaniach jako wydzielanie wyjściowe żółci, utrzymywane było przez pierwsze 60 minut doświadczenia. W tym czasie żółć zbierano dwukrotnie w 30-minutowych odstępach, a następnie podawano VH, po czym określano wydzielanie żółci przez 4 również 30-minutowe okresy. Na każdej owcy wykonano co najmniej dwa pomiary odpowiedzi wydzielniczej żółci przed i po podaniu VH. Stosowany VH zawierał 100 mg/ml menbutonu (10% roztwór). VH podawano doustnie (p.o.) w trzech dawkach (7,5; 20 i 37,5 mg/kg m.c. przyjmując je odpowiednio jako dawki: minimalną, pośrednią i maksymalną wg dostępnej literatury) oraz dożylnie (i.v.) w dawce 12 mg/kg m.c.

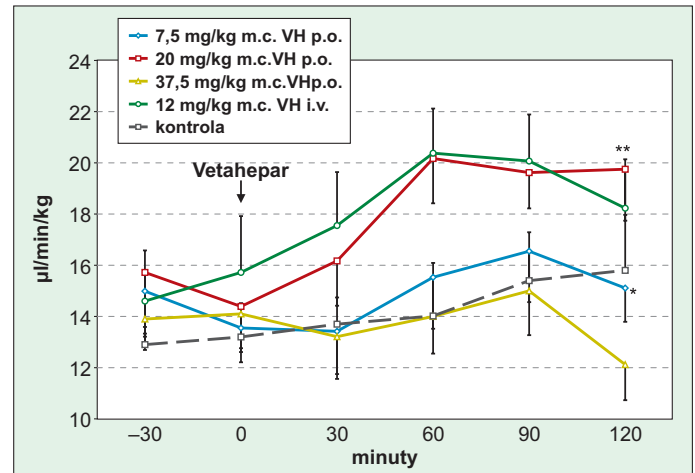
Całkowite stężenie soli żółciowych w żółci oznaczano spektrofotometrycznie metodą enzymatyczną. Stężenie menbutonu w osoczu krwi, po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym i odwirowaniu, oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu chromatografu firmy Waters wyposażonego w kolumnę 150 × 4,6 mm C 18 5 μm i detektor UV zakres 220 nm, fazą ruchomą był metanol: woda 3 : 2 (v/v) + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Wyniki podano w postaci średnich ± SE. Analizę statystyczną programem Anova przeprowadzono dla danych nieparzystych używając testu t-Studenta. Wyznaczono współczynnik korelacji i linię regresji dla wyrażenia zależności między poziomem VH w osoczu a wydzielaniem żółci u owiec, przyjmując jako istotną wartość  $p < 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

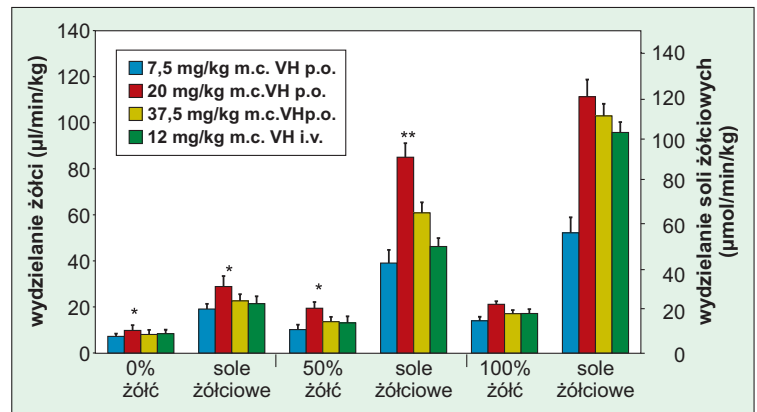
W okresie doświadczeń zwierzęta miały zachowany apetyt, nie wykazywały zmian w zachowaniu, utraciły około 10% m.c. z powodu pooperacyjnego zmniejszenia przyjmowania pokarmu i głodzenia przed każdym doświadczeniem.

Fluktuacje objętości wydzielanej żółci i soli żółciowych po podawaniu *per os* i dożylnie różnych dawek VH, przy zmiennym dopływie żółci do dwunastnicy (0%, 50% i 100%), przedstawia ryc. 1 i ryc. 2. W warunkach kontrolnych, przy 100% powrocie żółci do dwunastnicy dochodziło do zwiększenia wydzielania żółci, które istotnie ( $p \leq 0,05$ ) różniło się ( $19,23 \pm 8,55 \mu\text{l}/\text{min}/\text{kg m.c.}$ ) w porównaniu do średniego wydzielania wyjściowego ( $11,34 \pm 3,55 \mu\text{l}/\text{min}/\text{kg m.c.}$ ). Kontrolne wydzielanie żółci w warunkach 50% dopływu do dwunastnicy wzrastało od  $12,9 \pm 0,69 \mu\text{l}/\text{min}/\text{kg m.c.}$  do  $15,8 \pm 2,17 \mu\text{l}/\text{min}/\text{kg m.c.}$  w 120. minucie doświadczenia (ryc. 1) Zastosowanie doustnej dawki VH 20 mg/kg m.c. oraz dożylnej 12 mg/kg m.c. nasilało odpowiedź wydzielniczą żółci w 30. min., osiągając szczytowe wartości w 60. minucie (ryc. 1). Po 120 min. od podania VH dochodziło, z wyjątkiem odpowiedzi na VH w dawce 20 mg/kg m.c., do supresji nasilonego wydzielania żółci. Największe i istotne przy zwiększeniu wydzielania żółci miało miejsce po dawce p.o. 20 mg/kg m.c. i i.v. 12 mg/kg m.c. ( $p < 0,01$ ). Mimo iż największe wartości wydzielanej żółci otrzymano po stosowaniu VH przy 100% dopływie powrotnym żółci do dwunastnicy to przyrost objętości, w porównaniu do warunków przerwanych



Ryc. 1. Objętość żółci u owiec z 50% powrotem do dwunastnicy po podaniu Vetaheparu (VH) *per os* (p.o.) i dożylnie (i.v.)  $n = 4$

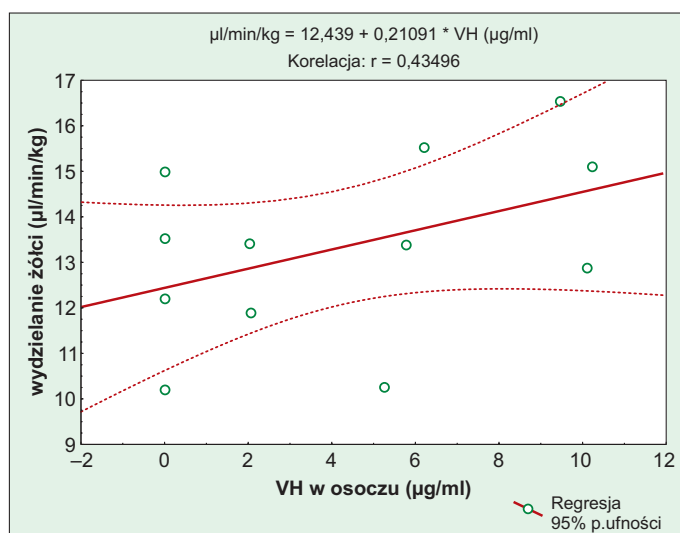
Objaśnienia: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



Ryc. 2. Zależność wydzielania żółci i soli żółciowych (s.ż) od % powracającej żółci do dwunastnicy przy podawaniu VH ( $n = 4$ )

dopływu żółci do dwunastnicy (0%), był najwyższy ( $p < 0,01$ ) pod wpływem VH przy zapewnieniu 50% dopływu powrotnego żółci do dwunastnicy (ryc. 2). Odpowiedzi wydzielnicze żółci stymulowane były zatem w największym stopniu wówczas, gdy do dwunastnicy powracało 50% endogennej żółci. Ilość wydzielanych do żółci soli żółciowych zwiększała się po 30 min. od podania VH. Zmiany były również najbardziej znamienne przy 50% powrocie żółci do dwunastnicy. Przyrost wydzielania soli żółciowych był największy po dawce 20 mg/kg m.c. VH (ryc. 2). Podawanie VH przy eliminacji (0%) dopływu żółci do dwunastnicy pozostawało, z wyjątkiem dawki 20 mg/kg m.c., bez wpływu zarówno na wydzielanie żółci, jak i soli żółciowych. Podana na ryc. 3 zależność między poziomami VH w osoczu a wydzielaniem żółci wskazuje na dodatnią korelację ( $r = 0,43$ ) między wartościami VH a objętością wydzielanej żółci oraz na możliwość wyliczenia wydzielania żółci w oparciu o poziom VH w osoczu krwi.

Po kolejnych powtórzeniach stosowanych dawek w iniekcjach dożylnych pojawiały się u owiec objawy w formie niepokoju, ślinotoku, rosnącego napięcia



Ryc. 3. Zależność między zawartością VH w osoczu a wydzielaniem żółci u owiec

mięśni szkieletowych, przechodzącego w łagodne drżenie niektórych mięśni: mięśnia trójgłowego ramienia, mięśnia pośladkowego powierzchownego. Objawów tych nie obserwowano przy podawaniu *per os*.

W dotychczasowej praktyce weterynaryjnej podawanie VH parenteralnie wiązało się każdorazowo z zaangażowaniem wykwalifikowanego personelu i unieruchamianiem zwierząt oraz z pewnym ryzykiem, zwłaszcza przy powtórnych iniekcjach, związanym z występowaniem objawów ubocznych (niepokój, ślinotok, drżenie mięśni). Podjęto, w związku z tym, próbę zastosowania VH drogą doustną. Była ona o tyle uzasadniona, iż VH wchłania się z przewodu pokarmowego, co udowodniono na szczurach, a przypuszczalne rozszerzenie naczyń wątrobowych daje w efekcie rosnącą objętość żółci. W przeprowadzonych badaniach wykazano obecność VH we krwi po pół godziny od podania drogą doustną w dawce 20 mg/kg m.c. Zwiększająca się, już po 30 min. od podania, objętość wydzielanej żółci wskazuje na prawdopodobieństwo naczyniorozszerzającego działania w wątrobie tego preparatu. Największe rosnące zmiany wydzielania żółci stwierdzono jednak po 60 min. od podania VH, w okresie przypuszczalnie łącznego działania naczyniowego i bezpośredniego na hepatocyty.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że mechanizm działania VH, oprócz podawanego zwiększenia wątrobowego przepływu krwi (12), obejmuje również nasiloną sekrecję soli żółciowych, a wtórnie zwiększających przez to objętość wody w żółci (1, 10). Działanie naczyniowe jest szybkie, ujawnia się po kilkunastu minutach, natomiast wzbudzenie wątrobowego mechanizmu zależnego od soli żółciowych jest wolniejsze (7, 14), gdyż może dotyczyć albo stymulacji wątrobowej syntezy soli żółciowych, albo uruchomienia specjalnych dla soli żółciowych układów transportowych w błonie kanalików (10).

Skuteczność pobudzenia wydzielania żółci przez VH, zarówno przy podawaniu dożylnym, jak i doust-

nym okazuje się największa przy zmniejszeniu o 50% dopływu żółci do dwunastnicy. Odpowiedzi wydzielnicze żółci przy 50% dopływie do dwunastnicy po podaniu VH doustnie w ilości 20 mg/kg m.c., były zbliżone do stwierdzanych przy 100% dopływie żółci do dwunastnicy. Przytoczone zmiany przemawiają, przy stwierdzonym wzroście wydzielania soli żółciowych, raczej za pobudzeniem przez VH syntezy tych ostatnich, a nie zwiększaniem ich transportu. Gdyby VH pobudzał transport soli żółciowych, wówczas, przy 100% powrocie żółci do dwunastnicy, wydzielanie żółci byłoby znacznie większe. Nasiloną odpowiedź wydzielniczą przy 50% dopływie żółci do dwunastnicy podkreśla przydatność podawania VH w stanach zahamowania wydzielania żółci.

W podsumowaniu należy podać, iż VH wywiera pobudzający wpływ na wydzielanie żółci, zarówno poprzez relaksujący efekt naczyniowy, jak i hepatocytarne zwiększenie wydzielania soli żółciowych, zwłaszcza w stanach upośledzających ich krążenie enterohepatyczne.

### Piśmiennictwo

1. Aazer S. A., Murray M., Farrell G. C., Stacey N. H.: Selectivity and sensitivity of changes in serum bile acids during induction of cirrhosis in rats. *Hepatology* 1993, 5, 1224-1231.
2. Bobowiec R., Kosior-Korzecka U.: Relationships amongst liver bile salt clearance, bile secretion and infusion of lipids in calves. *J. Vet. Med.* 1999, 46, 409-420.
3. Bobowiec R., Martelli F., Sighieri C., Borowicz P.: Gallbladder pressure changes induced by caerulein, pilocarpine and bile salt in calves measured by radiotelemetry. *Polish J. Vet. Sci.* 2000, 3, 147-152.
4. Eder M. I., Miquel F. J., Jünger D., Paumgartner G., von Ritter C.: Reactive oxygen metabolites promote cholesterol crystal formation in model bile: role of lipid peroxidation. *Free Radical Biol. & Med.* 1996, 20, 743-749.
5. Garwacki S., Dąbrowski J., Dutkiewicz M.: Effect of carbachol and atropine on bile secretion in sheep. *Pol. Arch. Vet.* 1998, 28, 71-77.
6. Hassan A. S., Garwacki S., Dutkiewicz M., Dąbrowski J.: The changes of bile flow and its composition in sheep following liver damage by carbon tetrachloride. *Pol. Arch. Vet.* 1992, 32, 1-99.
7. Hofman A. F.: Targeting drugs to the enterohepatic circulation: lessons from bile acids and other endobiotics. *J. Con. Rel.* 1985, 2, 3-11.
8. Kaur B., Ahuja S. P.: Charakterization of biliary proteins and composition of bile from sheep and goats. *Zntbl. Vet. A* 1993, 40, 598-604.
9. Lammert F., Marschall H.-U., Glantz A., Matern S.: Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J. Hepatology* 2000, 33, 1012-1021.
10. Roland P. J., Oude E., Dirk K. F., Kuipers F., Jansen P. L. M., Groen A. K., Groothuis G. M. M.: Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanism of membrane transport. *Bioch. Bioph. Acta* 1995, 1241, 215-268.
11. Studziński T., Bobowiec R.: Wpływ sekretyny i chemicznej stymulacji dwunastnicy na funkcje neutralizacyjne soku trzustkowego i żółci u owiec. *Medycyna Wet.* 1979, 35, 443-447.
12. Symonds H. W.: The choleric effect of menbutone and clanobutin sodium in steers. *Vet. Rec.* 1982, 110, 423-425.
13. Verkade H. J., Vonk R. J., Kuipers F.: New insight into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology* 1995, 21, 1174-1183.
14. West H. J.: Evaluation of total serum bile acid concentrations for the diagnosis hepatobiliary disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 1991, 51, 133-140.
15. Wójcik M., Bobowiec R., Martelli F., Gazzano A.: The response of bile secretion and ubiquinone Q10 to hyperglycaemia in sheep. *Polish J. Vet. Sci.* 2003, 6, 183-188.

Adres autora: prof. dr hab. Ryszard Bobowiec, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: ryszard.bobowiec@ar.lublin.pl