

MIKROMORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE JETRE I BIOHEMIJSKE ANALIZE KRVI PACOVA TRETIRANIH GENTAMICINOM I VERAPAMILOM

Nenad Stojilković¹ i Milan Stoilković²

Primena antimikrobnih lekova, posebno aminoglikozidnog antibiotika gentamicina, kao i blokatora kalcijumskih kanala verapamila, može dovesti do prolaznog funkcionalnog oštećenja jetre.

Cilj rada bio je ispitivanje mikromorfoloških promena u jetri i biohemijskih promena u krvi pacova tretiranih gentamicinom i verapamilom.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 20 pacova podeljenih u dve grupe, eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalna grupa (10 pacova) tretirana je gentamicinom (100 mg/kg TM/24 h) i verapamilom (3 mg/kg TM/24 h) u toku 8 dana. Kontrolna grupa (10 pacova) dobijala je fiziološki rastvor (1 ml/kg TM/24 h) u istom periodu. Ispitivane su mikromorfološke promene jetre i biohemijski parametri u krvi: transaminaze, bilirubin i glukoza.

Kod kontrolne grupe životinja bila je prisutna jasna lobularna građa jetre. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Analiza biohemijskih parametara u krvi pokazala je normalne vrednosti transaminaza (SGOT 29.5 +/-7.4 iu/l; SGPT 31.7 +/-6.9 iu/l), totalnog bilirubina (3.1 +/-0.9 mmol/l) i glukoze (4.9 +/-0.9 mmol/l). U eksperimentalnoj grupi životinja hepatociti sve tri zone bili su podjednako oštećeni. U citoplazmi je nađena vakuolarna degeneracija, dok je u jedru kondenzacija hromatina na periferiji smanjena i nukleoplazma svetla. Acidofilna degeneracija uz piknozu i hiperhromaziju jedara lokalizovane su u periportnoj zoni lobulusa. Analiza biohemijskih parametara u krvi pokazala je visok nivo transaminaza (SGOT 46.4 +/-4.7 iu/L; SGPT 50.8 +/-6.1 iu/l), totalnog bilirubina (12.8 +/-1.7 mmol/l) i glukoze (9.3 +/-1.8 mmol/l). Postoji statistički značajna razlika u biohemijskim parametrima kod eksperimentalne grupe u odnosu na iste parametre kod kontrolne grupe životinja ($p < 0,001$).

Rezultati našeg eksperimentalnog istraživanja pokazuju jasnu korelaciju između aplikacije gentamicina i verapamila i navedenih promena. *Acta Medica Medianae* 2006;45(2):5-9.

Ključne reči: gentamicin, verapamil, hepatociti

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu¹
Institut za farmakologiju Univerziteta Illinois u Čikagu²

Kontakt: Nenad Stojilković
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta
Bulevar dr Zorana Djindjića 81
18000 Niš
Srbija i Crna Gora
Tel.: 018/226-644 lok 132
E-mail: ne-sto@eunet.yu

Uvod

Delovanje različitih hepatotropnih i hepatotoksičnih supstanci (lekovi, toksične materije, virusi) dovodi do mikromorfoloških, ultrastrukturnih i funkcionalnih promena i poremećaja jetre.

Jetra ima važnu detoksikacionu ulogu, kako od toksičnih materija koje se stvaraju u toku normalnog endogenog metabolizma, tako i od onih koji dolaze u organizam spolja, najčešće

preko digestivnog trakta. Glavna lokalizacija ove funkcije je u glatkom endoplazmatskom retikulumu, zahvaljujući njegovom enzimskom sistemu. Detoksikaciona funkcija jetre odnosi se na mnoge lekove, toksične materije, alkohol, bilirubin, morfijum, steroidne hormone i dr. Kao posledica aktivacije detoksikacionih procesa u hepatocitima javlja se hiperplazija glatkog endoplazmatskog retikuluma.

Većina procesa detoksikacije odvija se u mikrozomima hepatocita u kojima se nalaze enzimski sistemi, odgovorni za biotransformaciju toksičnih materija i biološki aktivnih jedinjenja. Detoksikacija se odvija procesima oksidacije, čime se neutrališe čitav niz organskih i neorganskih jedinjenja, procesima redukcije, kada se neorganska i organska toksična jedinjenja pretvaraju u manje toksična, procesima konjugacije, kada se stvaraju estarska jedinjenja. Većina unetih lekova, u organizmu, hemijski se menja i

izlučuje u obliku jednog ili više metaboličkih produkata. U metabolisanju nekih lekova mogu se stvoriti i metaboliti takve toksičnosti da posledično izazovu hepatotoksični efekat (1).

Eksperimentalne i kliničke studije pokazuju da antagonist kalcijumovih kanala, lek Verapamil, pokazuje neželjene farmakodinamske efekte u vidu hepatotoksičnog delovanja. Neka eksperimentalna istraživanja i kliničke studije takođe ukazuju da Verapamil, koji se najvećim delom metabolise u jetri, kod nekih bolesnika dovodi do abnormalnih povećanja jetrinih enzima u plazmi, što ukazuje na reverzibilno smanjenje hepatične funkcije (2,3).

Eksperimentalna ispitivanja izvedena na životinjama, pretežno se odnose na istraživanja ototoksičnosti, vestibulotoksičnosti i nefrotoksičnosti Gentamicina (4).

Neka ispitivanja toksičnosti Gentamicina pokazala su i njegov hepatotoksični efekat koji se izražava prolaznom hiperbilirubinemijom i povišenim vrednostima transaminaza u serumu, što ukazuje na prolazno funkcionalno oštećenje jetre.

Nagli razvitak farmaceutske industrije i širok dijapazon preparata, pre svega, antihipertenzivnih lekova i antibiotika širokog spektra (s obzirom na prevalencu oboljenja koja zahtevaju njihovu primenu) i ponekad njihova zloupotreba, može dovesti do nastanka hepatopatija, najčešće nepoznatog porekla. Zbog toga je namera ovog rada da sa još jednog aspekta osvetli mogućnost alteracije jetre lekovima i, na taj način, omogućiti prevenciju mogućih hepatopatija.

Cilj

Cilj našeg rada bio je da se sagledaju mikromorfološke promene u jetri kao i biohemijske promene u krvi pacova tretiranih Gentamicinom i Verapamilom.

Materijal i metode

Eksperiment je obuhvatio analizu 20 laboratorijskih belih pacova Wister soja, oba pola, telesne mase 250-300 g. Eksperimentalne životinje su podeljene u dve grupe, od kojih je jedna služila kao kontrolna. Ispitivanoj eksperimentalnoj grupi (10 pacova) intraperitonealno je aplikovan Gentamicin, u dozi od 100 mg/kgTT/24 časa i Verapamil u dozi od 3 mg/kgTT/ 24 časa u toku 8 dana. Kontrolnoj grupi životinja (10 pacova) intraperitonealno je aplikovan fiziološki rastvor u dozi od 1 ml/kgTT/24 časa, takođe, u periodu od 8 dana. Sve eksperimentalne životinje žrtvovane su devetog dana eksperimenta.

Za eksperimentalno ispitivanje mikromorfoloških promena uzimani su sveži isecci jetre, dok je za biohemijske analize krv uzimana iz aorte, neposredno posle anesteziranja i vivisekcije životinja.

Za mikromorfološko ispitivanje, isecci jetre eksperimentalne, kao i kontrone grupe, fiksirani su u 10% rastvora formaldehida. Nakon rutinske obrade tkiva u autotehnikonu i kalupljenja u parafinu, pravljeni su laboratorijski presecci deblji-

ne 5 μ m. Presecci su bojeni klasičnom hematoxilin-eozin (HE) metodom za ispitivanje histoloških promena.

Iz krvi pacova određivane su serumske vrednosti transaminaza (SGOT, SGPT), totalnog bilirubina i glukoze.

Statistička obrada dobijenih podataka vršena je izračunavanjem srednjih vrednosti, standardne devijacije, a statistička značajnost utvrđena je Studentovim t – testom.

Cela eksperimentalna studija urađena je na Medicinskom fakultetu u Nišu, na Institutu za fiziologiju, Institutu za patologiju i Institutu za biomedicinska istraživanja i elektronsku mikroskopiju, dok su biohemijske analize iz krvi pacova urađene u laboratoriji DZ u Nišu.

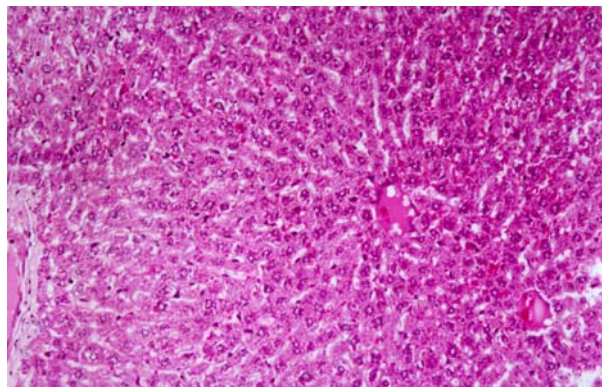
Rezultati

Histološke karakteristike jetre i biohemijske analize krvi kod kontrolne grupe životinja

a) Histološke karakteristike jetre

Analiza jetre kod kontrolne grupe životinja pokazuje normalnu histološku građu jetre.

Prisutna je jasna lobularna građa. U centru lobulusa je centralna vena, dok je na periferiji prisutan portalni ili Kiernanov interlobulusni prostor. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra (Slika 1). Razlika u građi perivenularne, intermedijarne i periportne zone nije uočljiva. Hepatociti imaju trabakularni raspored sa sinusoidalnim kapilarima između njih. Ovi kapilari su pokriveni glatkim endotelnim i Kupffer-ovim ćelijama, ovoidnih jedara i izrazito svetle nukleoplazme.



Slika 1. Normalna histološka građa jetre (HE, x 200)

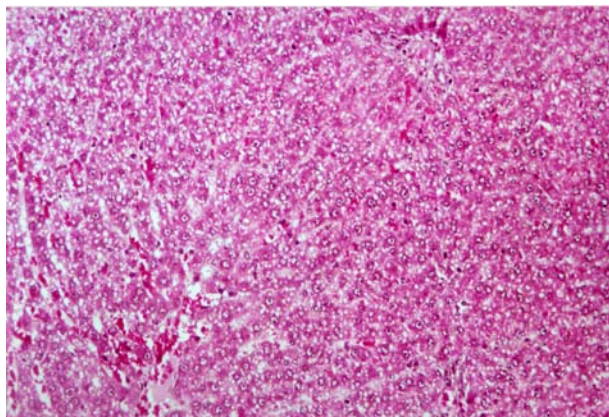
b) Biohemijske analize krvi

Biohemijske analize krvi kod kontrolne grupe pacova tretiranih fiziološkim rastvorom pokazuju normalne vrednosti transaminaza (SGOT 29.5 +/- 7.4 iu/l; SGPT 31.7 +/- 6.9 iu/l), totalnog bilirubina (3.1 +/- 0.9 mmol/l) i glukoze (4.9 +/- 0.9 mmol/l).

Analiza histoloških promena jetre i biohemijskih parametara u krvi kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih Gentamicinom i Verapamilom

a) Histološke karakteristike jetre

Hepatociti sve tri zone su podjednako oštećeni. U citoplazmi je nađeno bezbroj sitnih vakuola (vakuolarna degeneracija) dok je u jedru kondenzacija hromatina na periferiji smanjena i izrazito svetla, tj. hidropična nukleoplazma (Slika 2).



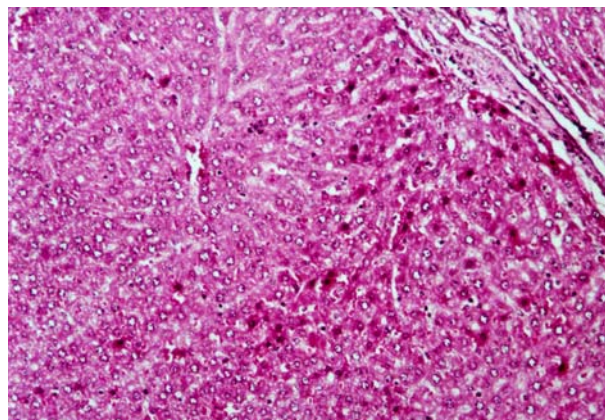
Slika 2. Mikrovakuolarna degeneracija hepatocita u svim zonama lobulusa (HE, x 100)

Teže promene tipa acidofilne degeneracije uz piknozu i hiperhromaziju jedara, lokalizovane su u periportnoj zoni lobulusa (Slika 3).

b) Biohemijske analize krvi

Analiza biohemijskih parametara u krvi pacova tretiranih Gentamicinom i Verapamilom pokazala je visok nivo transaminaza (SGOT 46.4 +/- 4.7 iu/l; SGPT 50.8 +/- 6.1 iu/l), totalnog bilirubina (12.8 +/- 1.7 mmol/l) i glukoze (9.3 +/- 1.8 mmol/l), što je bila statistički značajna razlika u odnosu na iste vrednosti kod kontrolne grupe životinja ($p < 0,001$).

Tabela 1 pokazuje analizu biohemijskih parametara u krvi pacova kontrolne i eksperimentalne grupe.



Slika 3. Acidofilna degeneracija periportnih hepatocita (HE, x 200)

Diskusija

Intraperitonealna aplikacija Gentamicina i Verapamila u određenim dozama i kombinacijama pacovima Wister soja u našem eksperimentu izazvala je čitav spektar histoloških lezija u jetri. Nastale mikromorfološke promene na hepatocitima odrazile su se na remećenje brojnih funkcija jetre, pre svega, na njenu ulogu u metaboličkim i detoksikacionim procesima. Ove promene dovele su i do remećenja procesa sinteze enzima i strukturnih proteina. S obzirom da hepatociti za ove funkcije koriste enzimske sisteme koji su u najvećem procentu (60%) lokalizovani u mitohondrijama, to je velika mogućnost da se pod dejstvom hepatotoksičnih supstanci ovi enzimski sistemi oštete ili poremete, čime se u znatnoj meri remeti homeostatska uloga jetre u organizmu. Efekti primenjenih lekova, bilo direktno ili indirektno (preko stvorenih metabolita) ispoljili su se u vidu degenerativnih promena. Navedene promene na hepatocitima nisu specifične i spadaju u lakše lezije jetre.

Tabela 1. Promene biohemijskih parametara i njihova statistička značajnost kod eksperimentalne grupe životinja u odnosu na kontrolnu grupu

Biohemijski parametri	Grupe		F-vrednost (p)*
	Kontrola	Eksperiment (G+V)	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
SGOT (iu/l)	29,5 ± 7,4	52,5±5,3	13,625 (p < 0,001)
SGPT (iu/l)	31,7 ± 6,9	57,1±5,9	24,352 (p < 0,001)
Glukoza (mmol/l)	4,9 ± 0,9	7,1±0,9	19,521 (p < 0,001)
Totalni bilirubin (mmol/l)	3,1 ± 0,9	15,2±1,2	80,084 (p < 0,001)

* Analiza varijanse u jednom pravcu (F - vrednost)

Histološka analiza jetre kod naše eksperimentalne grupe životinja tretiranih Gentamicinom i Verapamilom pokazala je histološke promene hepatocita u svim zonama acinusa. Hepatociti sve tri zone (perivenularna, intermedijarna i periportalna) bili su podjednako oštećeni. Naime, nađene su promene tipa mikrovakuolarne i acidofilne degeneracije uz piknozu i hiperhromaziju jedara. Ove promene su naročito bile izražene u periportalnoj zoni lobulusa.

Radovi Hoon-a (1986) ukazuju da se, kada je u pitanju Verapamil, radi o stereospecifičnom metabolizmu, gde se u jetri stvara najmanje 12 metabolita, koji se u plazmi mogu naći u znatno većoj koncentraciji od samog Verapamila, naročito kod peroralne aplikacije leka zbog fenomena prvog prolaska kroz jetru (5). U bolestima jetre, smanjeno je vezivanje Verapamila za proteine plazme zbog čega njegovi farmakološki efekti mogu biti potencirani (3). Potencijalna toksičnost Gentamicina ispitivana je preko urinarnog izlučivanja alanin aminopeptidaze kao indikatora potencijalne toksičnosti, hidrosolubilnog metabolita, koji se izlučuje putem bubrega.

Povišene vrednosti transaminaza SGPT i SGOT, kao i vrednosti totalnog bilirubina i glukoze su statistički signifikantne u odnosu na vrednosti kontrolne grupe pacova.

Radovi Jover-a i sar. (1998) pokazuju da aplikacija datih lekova dovodi do smanjenja metabolizma glikogena (6). Smanjenje glikogenskih depoa u uslovima hipoksije i ishemije je evidentno (7). Grana (1968) ukazuje da se pražnjenje glikogenskih rezervi uočava već nakon 30-45 min. od ishemije, a uslovljeno je karakteristikama mikrocirkulacije jetre (8). Razlika u količini pražnjenja glikogenskih depoa je zavisna i od stepena, odnosno metabolizma jetrinih ćelija. Smanjenje glikogenskih depoa dovodi do toga da su energetske rezerve nedovoljne da podrže ćelijske metaboličke reakcije, zbog čega može nastupiti ćelijska smrt (9). Glikogenoliza je povećana, što je laboratorijski, na našem eksperimentalnom materijalu, evidentirano značajnim povećanjem glikoze u krvi kod eksperimentalne grupe pacova tretiranih Gentamicinom i Verapamilom. Gubitak glikogena u depoima jetre označava smanjenje detoksikacione uloge hepatocita, pošto je isti iscrpljen zbog

njihove povećane aktivnosti u procesu detoksikacije.

Nalaz prolazne hiperglikemije posledica je pojačane glikogenolize u cilju boljeg snabdevanja energijom zbog inicijalne aktivacije metaboličkih i enzimskih procesa i aktivacije detoksikacionih reakcija u hepatocitima, kao glavnog biotransformacionog sistema organizma.

SGOT je bilokularni enzim i prisutan je u citoplazmi i u mitohondrijama hepatocita, a SGPT je unilokularni enzim i nalazi se u citoplazmi hepatocita. Porast njihove aktivnosti u serumu i odnos SGOT/SGPT je mera oštećenja jetrinih ćelija (10). U našem eksperimentu vrednosti SGPT bile su značajno povećane kod eksperimentalne grupe životinja, što je u vezi sa histomorfološkim i funkcionalnim oštećenjem hepatocita koje je kod ove eksperimentalne grupe veoma evidentno.

Ovako promenjene vrednosti navedenih biohemijskih parametara ukazuju na funkcionalno oštećenje jetre pacova izazvano unošenjem lekova Gentamicina i Verapamila.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata iz eksperimentalne i kontrolne grupe životinja, može se zaključiti da navedene mikromorfološke promene u jetri, kao i biohemijske promene u krvi pacova tretiranih Gentamicinom i Verapamilom ukazuju na smanjenje detoksikacione uloge hepatocita. Izmenjeni biohemijski parametri su marker funkcionalnog oštećenja hepatocita i manifestuju se hiperbilirubinemijom, povišenim vrednostima transaminaza u serumu, kao i znatno uvećanim vrednostima glukoze u krvi pacova tretiranih Gentamicinom i Verapamilom.

Na osnovu dobijenih rezultata komparativnog proučavanja histoloških i biohemijskih promena, može se zaključiti da postoji značajna korelacija između aplikacije Gentamicina i Verapamila i navedenih promena.

Autori smatraju da bi pri indikaciji lekova iz grupe blokatora kalcijumskih kanala, kao što je Verapamil i lekova iz grupe aminoglikozida kao što je u našem slučaju Gentamicin, trebalo imati u vidu i neželjene efekte ovih lekova na jetru.

Literatura

1. Kaplowitz M. Principles of drug metabolism and their contribution to understanding hepatotoxicity. Postgraduate Course of Current hepatology update on Science and Practice. Chicago; AASLD: 1988. p.1 59-70.
2. Coupland WA. Beta adrenoreceptor antagonists and antianginal drugs In Mayer Side Effect of Drugs, Dukes M.N.G. and Beeley L. editor. 162. Amsterdam; Elsevier: 1989.
3. Martindale: The extra pharmacopoeia. London. The Pharmaceutical press: Edition 29th; 1990.
4. Bennet WM, Elliot WC, Houghton DC, Gilbert DN, Defehr J, McCarron DA. Reduction of experimental gentamicin nephrotoxicity in rats by dietary calcium loading. Antimicrob. Agents Chemother 1982; 22: 508-12.
5. Hoon TJ, Bauman JL, Rodvold A. The pharmacodynamic and pharmacokinetic differences of the D- and L-isomers of verapamil implications in the treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia. Am Heart J 1986; 112: 296-403.

6. Jover R, Lechon MJG, Donato T, Ponsoda X, Rodrigues C. Long term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three dimensional collagen matrix. *Journal of Cellular Physiology* 1998;177(4): 553-62.
7. Vuković R. Dinamika promena sinusoidalnog volumena jetre u uslovima hladne ishemije. Doktorska disertacija Novi Sad; 1994.
8. Grana L, Soladana M, Donellan WM, Swenson O. Immediate and Longterm effects. *Vascular Lesions* in experimental liver ischemia. *Arch Surg* 1968; 97: 500-13.
9. Gerlach E, Denticke B, Dreisbach RH. Zum Verhalten von Nucleotiden und Ihren Dephosphorylierten Ablauprodukten in der Niere bei Ischemie und Kurzzeitger post - Ischemiker Wiederburchblutung. *Fleuger Arch Ges Physiol* 1963;278: 296 - 315.
10. Perišić V. Jetra. U: Specijalna klinička fiziologija. Stefanović S. Editor. 394-423. Beograd; Medicinska knjiga: 1988.

MICROMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE LIVER AND BIOCHEMICAL ANALYSES IN THE BLOOD OF RATS TREATED BY GENTAMICIN AND VERAPAMIL

Nenad Stojiljkovic and Milan Stoiljkovic

The use of antimicrobial drugs, especially gentamicin and calcium blocker verapamil, may cause transitional functional damage of the liver.

The aim of this study is to explore micro-morphological changes in the liver and biochemical changes in the blood of rats treated with gentamicin and verapamil.

The research included 20 rats divided in experimental and control group. The experimental group (10 rats) was treated with gentamicin (100 mg/kg/BW/24h) and verapamil (3 mg/kg/BW/24 h) for 8 days. The control group (10 rats) received physiological solution (1 ml/kg/BW/24 h) at the same time. We analyzed micro-morphological changes in the liver and biochemical parameters in blood: transaminase, bilirubin and glucose.

In the control group, there was a normal lobular liver structure. All hepatocytes had polygonal shape, pink cytoplasm and the location of nucleus was central or paracentral. Biochemical blood analysis showed normal level of transaminase (SGOT 29.5 +/- 7.4 iu/l; SGPT 31.7 +/- 6.9 iu/l), total bilirubin (3.1 +/- 0.9 mmol/l) and glucose (4.9 +/- 0.9 mmol/l). In the experimental group of animals, hepatocytes of all three zones were equally damaged. In the cytoplasm, we found vacuolar degeneration, reduced condensation of chromatin in nucleus and light nucleoplasm. Hepatocytes of the periportal zone had acidophilic degeneration, picnotic and hyperchromatic nuclei. Biochemical blood analysis showed high level of transaminase (SGOT 46.4 +/- 4.7 iu/l; SGPT 50.8 +/- 6.1 iu/l), total bilirubin (12.8 +/- 1.7 mmol/l) and glucose (9.3 +/- 1.8 mmol/l). There is a statistically significant difference in biochemical parameters between the two groups ($p < 0,001$).

The results of our experimental study suggest that there is an obvious correlation between application of gentamicin and verapamil and these changes. *Acta Medica Medianae* 2006;45(2):5-9.

Key words: *gentamicin, verapamil, hepatocytes*