

MIKROMORFOLOŠKE I HISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE JETRE PACOVA TRETIRANIH GENTAMICINOM

Nenad Stojiljković¹ i Milan Stojiljković²

Jetra je jedinstven organ ljudskog organizma zbog svoje lokalizacije i funkcija koje omogućavaju normalnu homeostazu. Delovanje različitih hepatotoksičnih supstanci dovode do mikromorfoloških, ultrastrukturnih, funkcionalnih promena i poremećaja jetre. Neka ispitivanja toksičnosti gentamicina pokazala su i njegov hepatotoksični efekat, na šta ukazuje prolazno funkcionalno oštećenje jetre.

Ispitivane su mikromorfološke i histohemijske promene u jetri pacova tretiranih gentamicinom.

Eksperiment je obuhvatio 20 laboratorijskih pacova koji su podeljeni na eksperimentalnu (10 pacova) i kontrolnu grupu (10 pacova). Eksperimentalna grupa je tretirana gentamicinom (100 mg/kg/TM/24 h) u toku 8 dana, a kontrolna fiziološkim rastvorom (1 ml/kg/TM/24 h).

U eksperimentalnoj grupi životinja tretiranih gentamicinom, nađene su lakše degenerativne promene tipa vakuoalizacione jedara i granularne, kao i vakuolarne parenhimatozne degeneracije ("mutno bubrenje") prisutne u periportalnoj i intermedijalnoj zoni lobulusa. Hepatociti u perivenularnoj zoni bili su bez patohistoloških promena. Prisutan je akutni venski zastoj tipa dilatacije centralne venule i kapilara. Granična ploča koju čine periportalno lokalizovani hepatociti je hiperaktivna i manifestuje se velikim hiperhromnim jedrima. Sadržaj glikogena je smanjen u hepatocitima sa vakuolarnom degeneracijom. U perivenularnoj zoni glikogen je bio prisutan u normalnoj količini.

Kod kontrolne grupe životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, bila je prisutna jasna lobularna građa jetre. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Razlika u građi perivenularne, intermedijarne i periportalne zone nije bila uočljiva. Hepatociti su sa trabekularnim rasporedom i sa sinusoidalnim kapilarima između njih. Glikogen je kod kontrolne grupe životinja bio deponovan u čitavoj citoplazmi, u većoj količini, u vidu purpurno crvenih granula. Distribucija glikogena po zonama bila je uniformna.

Rezultati našeg eksperimentalnog istraživanja pokazuju jasnu korelaciju između aplikacije gentamicina i navedenih promena. *Acta Medica Medianae 2006;45(3):24-28.*

Ključne reči: gentamicin, hepatociti, glikogen

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

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

Uvod

Jetra je jedinstven, a moglo bi se reći i savršen organ ljudskog organizma, ne samo zbog svoje anatomske lokalizacije već i mnogobrojnih funkcija koje omogućavaju normalnu homeostazu organizma. Delovanje različitih hepatotropnih i hepatotoksičnih supstanci (lekovi, toksične materije, virusi...) dovode do mikromorfoloških, ultrastrukturnih i funkcionalnih promena i poremećaja jetre. Hepatocit je glavno mesto biotransformacijskih sistema koji svojim enzimima omogućavaju da se metaboliti ovih jedinjenja i supstancija

izluče iz organizma ili ih učine manje toksičnim. Lekove metaboliše poseban enzimski sistem u ćelijama jetre, koja je glavni organ za biotransformaciju lekova. Najveći značaj imaju mikrozomni enzimi jetre, dok manjim delom, u biotransformaciji učestvuju enzimi lokalizovani u citoplazmi i mitohondrijama hepatocita. U metaboliisanju nekih lekova mogu se stvoriti i metaboliti takve toksičnosti da posledično izazovu hepatotoksični efekat (1). Studijska ispitivanja poslednjih godina ukazuju na uzročnu povezanost delovanja hepatotoksičnih supstanci sa određenim morfološkim, ultrastrukturnim i funkcionalnim promenama u jetri, kao i poremećajima njene enzimske aktivnosti (2). Hepatotoksičnost ovih supstanci može se verifikovati različitim metodama: histohemijskim, enzimohistohemijskim, elektronskom mikroskopijom, kompjuterizovanim određivanjem različitih biohemijskih parametara u krvi i drugim savremenim metodama. U literaturi postoje podaci o hepatotoksičnom delovanju brojnih materija (tetraciklini, citostatici, antitu-

berkulotici, alkohol itd.) (3). Za razliku od navedenih materija, malo je podataka o efektima aminoglikozidnih antibiotika na promenu funkcije jetre.

Eksperimentalna ispitivanja izvedena na životinjama, pretežno se odnose na istraživanja citoksičnosti, vestibulotoksičnosti i nefrotoksičnosti Gentamicina (5). Istraživanja su vršena i kod čoveka u smislu ispitivanja potencijalne toksičnosti.

Neka ispitivanja toksičnosti aminoglikozidnog antibiotika 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.

Cilj istraživanja

Cilj rada je sagledati mikromorfološke i histohemijske promene u jetri pacova tretiranih gentamicinom, kao i pokazati da zloupotreba gentamicina, može dovesti do nastanka hepatopatija, najčešće nepoznatog porekla. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog rada da osvetli sa još jednog aspekta mogućnost alteracije jetre ovim antibiotikom i na taj način omogući prevenciju mogućih hepatopatija.

Materijal i metode

Eksperiment je obuhvatio analizu 20 laboratorijskih belih pacova Wistar soja, oba pola, telesne mase 250-300 g. Eksperimentalne životinje su podeljene u II 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 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 i histohemijskih uzimani su sveži isečci jetre neposredno posle anesteziranja i vivisekcije životinja.

Za mikromorfološko ispitivanje isečci jetre eksperimentalne kao i kontrolne grupe životinja fiksirani su u 10% rastvora formaldehida. Nakon rutinske obrade tkiva u autotehniku i kalupljenja u parafinu pravljene su laboratorijski preseci debljine 5 mikrometara. Preseci su bojeni sledećim metodama:

1. Klasična hematoksilin-eozin (HE) metoda za ispitivanje histoloških promena.

2. Histohemijska metoda za verifikaciju nađenih histoloških lezija i to:

PAS - za bojenje deponovanog glikogena. Određivanje sadržaja glikogena obavljeno je semikvantitativnom metodom, tako što je njegova normalna količina označavana sa (+++), smanjenje I stepena sa (++), smanjenje II stepena sa (+/-), a potpuno odsustvo sa (-).

Cela eksperimentalna studija urađena je u Institutu za fiziologiju, Institutu za Patologiju i Institutu za biomedicinska istraživanja i elek-

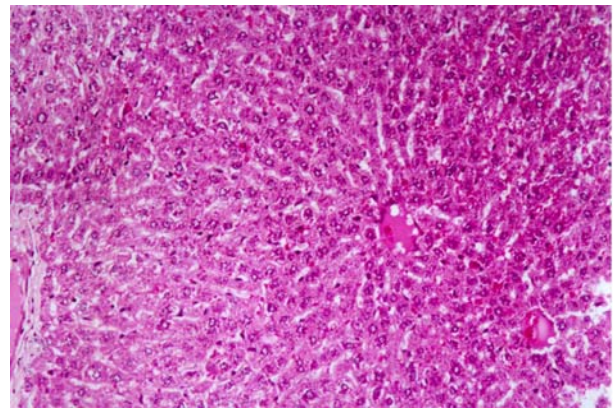
tronsku mikroskopiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

Rezultati istraživanja

Analiza jetre kod kontrolne grupe

a) Histološke karakteristike jetre

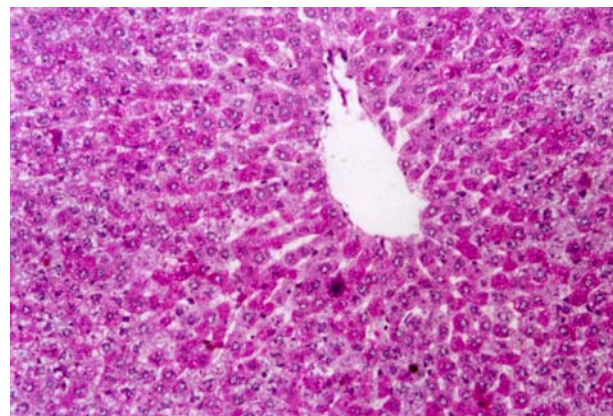
Prisutna je jasna lobularna građa jetre: u centru lobulusa je centralna vena, dok je na periferiji prisutan portalni ili Kiernanov interlobul-usni prostor. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra (Slika 1). Razlika u građi perivenularne, intermedijarne i periportne zone nije uočljiva. Hepatociti imaju trabekularni 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) Histohemijska detekcija glikogena

Glikogen je deponovan u čitavoj citoplazmi, u većoj količini (+++), u vidu purpurno crvenih granula (Slika 2). Distribucija glikogena po zonama je uniformna.



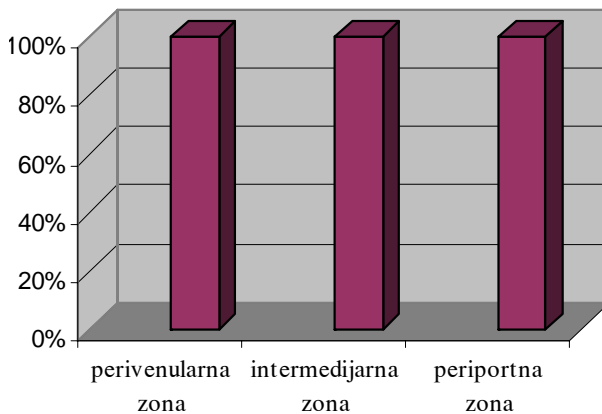
Slika 2. Purpurno crvene guste granule u celjoj citoplazmi hepatocita (PAS, x 200)

Analiza jetre kod kontrolne grupe životinja pokazuje normalnu histološku građu jetre, kao i normalnu zonalnu distribuciju glikogena što je prikazano na Tabeli 1 i Grafikonu 1. Glikogen se u vidu gustih PAS pozitivnih granula nalazi u hepatocitima sve tri zone acinusa (perivenularnoj zo-

ni, intermedijarnoj zoni i periportnoj zoni) što ukazuje na potpunu očuvanost glikogena.

Tabela 1. Potpuno očuvan sadržaj glikogena kod kontrolne grupe životinja

Zonalna distribucija glikogena	
Perivenularna zona	+++
Intermedijarna zona	+++
Periportna zona	+++

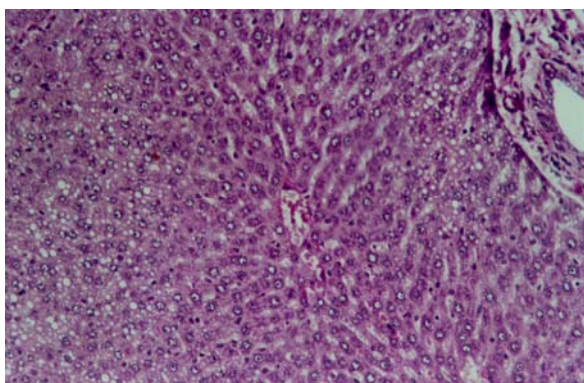


Grafikon 1. Očuvanost glikogena u zonama acinusa

Analiza histoloških i histoheмиjskih promena kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih gentamicinom

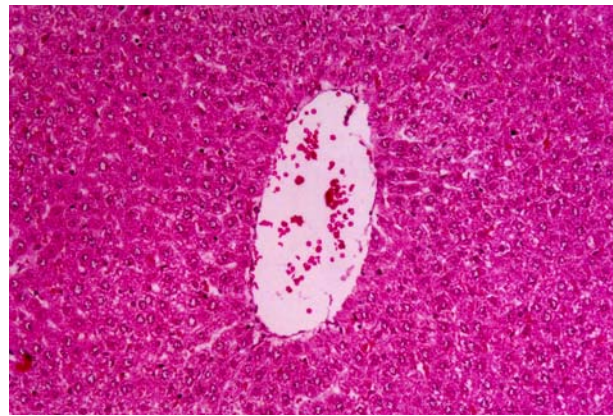
a) Histološke karakteristike jetre

Lakše degenerativne promene tipa vakuolizacije jedara i granularne, kao i vakuolarne parenhimatozne degeneracije ("mutno bubrenje") prisutne su u periportnoj i intermedijalnoj zoni lobulusa (Slika 3).

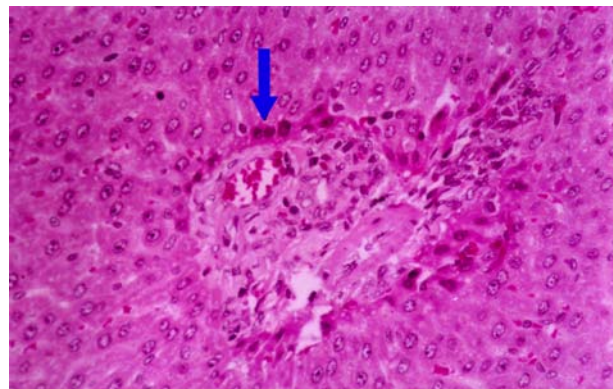


Slika 3. Vakuolarna degeneracija u periportnoj i intermedijalnoj zoni lobulusa PAS, x 200

Hepatociti u perivenularnoj zoni su bez patohistoloških promena. Akutni venski zastoj tipa dilatacije centralne venule i kapilara je markantan difuzno (Slika 4). Granična (regenerativna) ploča koju čine periportno lokalizovani hepatociti je hiperaktivna manifestujući se velikim hiperhromnim jezdrima (Slika 5).



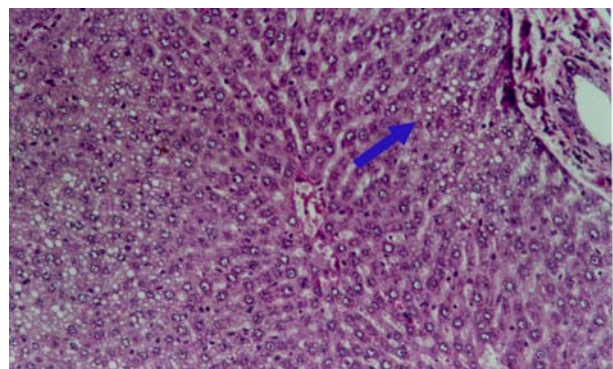
Slika 4. Dilatacija centralne venule (HE, x 200)



Slika 5. Hiperaktivni hepatociti u periportnoj (regenerativnoj) zoni (HE, x 400)

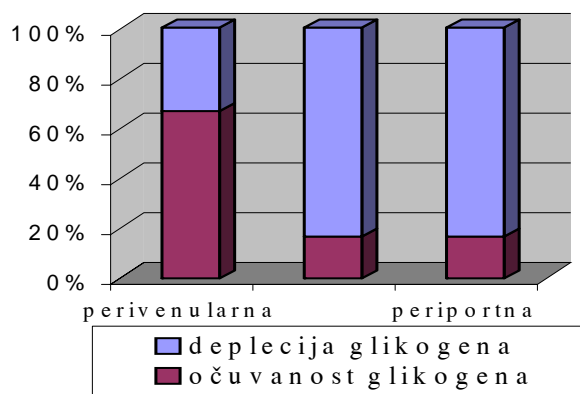
b) Histoheмиjska detekcija glikogena

Sadržaj glikogena je smanjen (\pm) u hepatocitima sa vakuolarnom degeneracijom (Slika 6). U perivenularnoj zoni glikogen je prisutan u normalnoj količini (++)



Slika 6. Redukcija glikogena je markantna u citoplazmi hepatocita sa vakuolarnom degeneracijom (PAS, x 200)

Analiza jetre kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih Gentamicinom pokazuje lakše degenerativne promene tipa vakuolizacije jedara i vakuolarne parenhimatozne degeneracije ("mutno bubrenje"). Sadržaj glikogena je očuvan u perivenularnoj zoni acinusa, dok je u zonama sa vakuolarnom degeneracijom smanjen, što je prikazano na Tabeli 2 i Grafikonu 2.



Grafikon 2. Očuvanost i deplecija glikogena u pojedinim zonama acinusa kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih Gentamicinom

Tabela 2. Očuvanost i deplecija glikogena kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih Gentamicinom

Zonalna distribucija glikogena	
Perivenularna zona	++
Intermedijalna zona	±
Periportna zona	±

Diskusija

Intraperitonealna aplikacija gentamicina pacovima Wister soja, u našem eksperimentu izazvala je čitav niz histoloških lezija u jetri. Nastale histološke, odnosno mikromorfološke promene na hepatocitima odrazile su se na remećenje brojnih funkcija jetre, pre svega, na njenu ulogu u metaboličkim i detoksikacionim procesima.

Efekti primene aminoglikozidnog antibiotika gentamicina, bilo direktno ili indirektno (preko stvorenih metabolita) ispoljili su se u vidu lakših degenerativnih promena. Navedene promene na hepatocitima nisu specifične i spadaju u lakše lezije jetre. Naime, kratkotrajno delovanje hemijskih, toksičnih ili drugih supstanci izaziva mutno bubrenje i vezikularnu degeneraciju hepatocita. Ovi efekti su posledica oštećenja mitohondrija, sinteze ATP-a, a samim tim i nedostatka energije za aktivnost membranske ATP-aze. Na ovaj način je omogućeno ulaženje jona Na i vode u citoplazmu hepatocita, zbog čega bubre strukturni proteini (mutno bubrenje), a u kasnijoj fazi i matriks organela, uz degranulaciju rapavog endoplazmatiskog retikuluma (rER).

Neka istraživanja pokazuju potencijalnu toksičnost gentamicina koja je ispitivana preko urinarnog izlučivanja alanin aminopeptidaze kao indikatora potencijalne toksičnosti, hidrosolubilnog metabolita, povećane aktivnosti, koji se izlučuje putem bubrega.

Na našem eksperimentalnom materijalu najveća zastupljenost histoloških promena u vidu acidofilne degeneracije i promene tipa "mutnog bubrenja" uglavnom su prisutne u intermedijalnoj i periportnoj zoni acinusa. Periportna zona acinusa je dobro snabdevena kiseonikom i hranljivim materijama iz portalne vene i hepaticne arterije, te je zbog toga relativno zaštićena u odnosu

na dve ostale zone (5). Međutim, rezultati našeg eksperimentalnog rada pokazali su prisustvo navedenih mikromorfoloških promena i u periportnoj zoni acinusa, što se može povezati sa bržom distribucijom aplikovane doze gentamicina do ove zone acinusa i ispoljavanja njegovog hepatotoksičnog efekta.

Histološke promene kod grupe životinja tretirane gentamicinom uslovile su i depleciju glikogena. Deplecija glikogena bila je najzastupljenija u intermedijalnoj i periportnoj zoni acinusa, dok je delimična očuvanost glikogena nađena u perivenularnoj zoni. Na našem eksperimentalnom materijalu, smanjenje glikogena bilo je proporcionalno stepenu morfoloških promena na hepatocitima. Aplikacija gentamicina dovodi do smanjenja metabolizma glikogena (6). Zbog toga je smanjenje glikogena najizraženije u hepatocitima intermedijarne i periportne zone acinusa gde su nađene lakše degenerativne promene, kao i promene tipa vakuolarne parenhimatozne degeneracije ("mutno bubrenje").

Smanjenje glikogenskih depoa u uslovima hipoksije i ishemije je evidentno (7). (8), ukazuje da se pražnjenje glikogenskih rezervi uočava već nakon 30-45 minuta od ishemije, a uslovljeno je karakteristikama mikrocirkulacije jetre. Razlika u količini pražnjenja glikogenskih depoa je zavisna i od stepena, odnosno metabolizma jetrićnih ćelija. Smanjenje glikogenskih depoa dovodi do toga da su energetske rezerve nedovoljne da podrže ćelijske metaboličke reakcije, zbog čega može nastupiti ćelijska smrt (9).

Gubitak glikogena u depoima jetre označava smanjenje detoksikacione uloge hepatocita, pošto je isti iscrpljen zbog njihove povećane aktivnosti u procesu detoksikacije.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata iz eksperimentalne i kontrolne grupe životinja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih gentamicinom nađene su lakše degenerativne promene tipa vakuolarne parenhimatozne degeneracije ("mutno bubrenje").
2. Mikromorfološke promene bile su uglavnom zastupljene u intermedijalnoj i periportnoj zoni acinusa.
3. Deplecija glikogena bila je proporcionalna stepenu nađenih mikromorfoloških promena kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih gentamicinom.
4. Rezultati komparativnog proučavanja mikromorfoloških i histohemijskih promena potvrđuju postojanje značajne korelacije između aplikacije gentamicina i navedenih promena.
5. Kod verifikovanih bolesti jetre pri indikaciji lekova iz grupe aminoglikozida, neophodno je imati u vidu i neželjene efekte ovih lekova na jetru.

Literatura

1. Kaplowitz M. Principles of drug metabolism and their contribution to understanding hepatotoxicity. Post-graduate Course of Current hepatology update on Science and Practice. AASLD. Chicago 1988;159-70.
2. Hill PD, Plummer JL, Hasley AH, Cousins MJ. Histopathology of drug-induced liver disease. In: Farrell GC, editor. Drug Induced Liver Disease. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.p. 115-51.
3. Perišić V. Jetra. U: Stefanović S.(ur.). Specijalna klinička fiziologija. Beograd: Medicinska knjiga: 1988; 394-423.
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 Chemoter 1982; 22: 508-12.
5. Craig JR. Liver. In: Kissane JM, editor. Andesons Pathology. Toronto: CV Mosby Co St Louis; 1990. p.964-1011.
6. Lechon MJG, Jover R, 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, Univerzitet u Novom Sadu; 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 Abbauprodukten in der Niere bei Ischemie und Kurzzeitiger post - Ischemiker Wiederburchblutung. Fleuger Arch Ges Physiol 1963; 278:296-315.

MICROMORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF A RAT'S LIVER TREATED WITH GENTAMICIN

Nenad Stojilkovic and Milan Stoilkovic

The liver is a unique organ of human body because of its location and functions which enable normal homeostasis. The effects of different hepatotoxic substances cause micromorphological, ultrastructural and functional changes and liver disorders. Some researches of gentamicin toxic effect showed its hepatotoxic effect which caused a short-term functional liver disorder.

Micromorphological and histochemical changes were examined in the liver of the rat treated with gentamicin.

The research included 20 rats, the experimental (10 rats) and control group (10 rats). The experimental group was treated with gentamicin during the period of 8 days, while the control group was treated with physiological solution.

In the experimental group of animals treated with gentamicin, slight degenerative changes were found such as vacuolization of nucleus and granular changes, and vacuolar parenchymatous degeneration ("unclear bubbling") which are present in the periportal and intermediar zone of lobulus. There were no pathohistological changes in hepatocytes in the perivenular zone. Acute vein stasis such as dilatation of the central venula and capillaries were present. Boundary (regenerative) panel which consist of periportally localized hepatocytes is hyperactive and is manifested in large hyperchromic nuclei. The amount of glycogen is reduced in hepatocytes with vacuolar degeneration. In the perivenular zone, glycogen was present in the normal amount.

In control group of animals treated with physiological solution, a clear lobular construction of liver was present. Hepatocytes are of polygonal shape and pink cytoplasm and centrally or paracentrally localized nucleus. The difference in construction of perivenular, intermediar and periportal zone was not noticed. Hepatocytes had trabecular arrangement and sinusoidal capillaries in between. In the control group of animals, glycogen was stored in a larger quantity in the entire cytoplasm, in the form of purple- red granules. The distribution of glycogen in the zones was equal.

The results of our experimental research showed a clear correlation between the application of gentamicin and the aforesaid changes. *Acta Medica Medianae* 2006;45(3):24-28.

Key words: gentamicin, hepatocytes, glycogen