

# HISTOLOŠKE I HISTOHEMIJSKE PROMENE U JETRI PACOVA TRETIRANIH GENTAMICINOM I ENALAPRILOM

Nenad Stojiljković\*, Dragoljub Jovanović\*, Slavimir Veljković\*, Goran Ranković\*, Voja Pavlović\*,  
Dragan Radovanović\*\* i Milan Stoiljković\*\*\*

Ispitivane su histološke i histohemijske promene u jetri pacova tretiranih gentamicinom i enalaprilom.

U eksperimentalnoj grupi životinja (10 pacova) tretiranih gentamicinom u dozi od 100 mg/kgTT/24 h i enalaprilom u dozi od 1 mg/kg/TT/24 h u toku 8 dana, nađeno je da su u svim lobulusima jetre promene bile skoncentrisane na periportnu i intermedijarnu zonu. U citoplazmi ovih hepatocita nađene su manje masne kapi koje potiskuju jedro i rub citoplazme ka ćelijskoj membrani. Istovremeno je bila prisutna retka acidofilna degeneracija hepatocita. Redukcija glikogena (+) kod eksperimentalne grupe pacova bila je proporcionalna distribuciji mikrokapljičaste masne promene. U intaktnoj perivenularnoj zoni acinusa glikogen je nađen u većoj količini (++).

Kod kontrolne grupe životinja (10 pacova) tretiranih fiziološkim rastvorom (1 ml/kg TT/24 h), bila je prisutna jasna lobularna građa jetre. Svi hepatociti bili su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Razlika u građi perivenularne, intermedijarne i periportne zone nije bila uočljiva. Hepatociti kontrolne grupe pacova imali su trabakularni raspored sa sinusoidalnim kapilarima između njih, koji su pokriveni glatkim endotelnim i Kupffer-ovim ćelijama koje su ovoidnih jedara i izrazito svetle nukleoplazme. Glikogen je biodeponovan u čitavoj citoplazmi u većoj količini (+++), u vidu purpurno crvenih granula. Distribucija glikogena po zonama bila je uniformna.

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 primenjenih lekova, bilo direktno ili indirektno (preko stvorenih metabolita), ispoljili su se u vidu degenerativnih i reaktivnih zapaljenjskih promena.

Na osnovu dobijenih rezultata komparativnog proučavanja histoloških i histohemijskih promena, može se zaključiti da postoji značajna korelacija između aplikacije gentamicina i enalapрила i navedenih promena. *Acta Medica Medianae 2004; 43(2): 19-22.*

**Ključne reči:** jetra, Gentamicin, Enalapril

---

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu\*  
Fakultet fizičke kulture u Nišu\*\*  
Medicinski fakultet u Nišu\*\*\*

**Kontakt:** Nenad Stojiljković  
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta  
Bulevar Dr Zorana Dinkića 81  
18000 Niš, Srbija i Crna Gora  
Tel.: 018/326-644 lok. 132, e-mail: ne-sto@eunet.yu

## Uvod

Delovanje različitih hepatotropnih i hepatotoksičnih supstanci (lekovi, toksične materije, virusi) dovode 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 koje dolaze u organizam spolja, najčešće preko digestivnog trakta. Glavna lokalizacija ove funkcije je u glatkom endoplazmatskom retikulumu (sER), zahvaljujući njegovom

enzimskom sistemu. Detoksikaciona funkcija jetre se odnosi 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 se hemijski 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 antihipertenzivni lek enalapril pokazuje neželjene farmakodinamske efekte u vidu hepatotoksičnog delovanja. Citotoksičnost enalapрила posledica je smanjenja detoksikacionih sposobnosti putem konjugacije sa glutationom (2,3).

Primena antimikrobnih lekova, posebno aminoglikozidnog antibiotika gentamicina može dovesti do povećanja vrednosti bilirubina i kreatinina u serumu, što ukazuje na prolazno funkcionalno oštećenje jetre.

### Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je da se sagledaju histološke i histoheimijske promene u jetri pacova tretiranih gentamicinom i enalaprilom.

### Materijal i metode

Studija je obuhvatila analizu 20 laboratorijskih belih pacova Wister soja, oba pola, telesne mase 250 do 300 g. Eksperimentalne životinje su podcijene u dve eksperimentalne grupe, od kojih je jedna služila kao kontrola. Ispitivanoj eksperimentalnoj grupi intraperitonealno je aplikovan Gentamicin u dozi 100 mg/kgTT/ 24 časa i Enalapril u dozi od 1 mg/kgTT/ 24 časa u trajanju od 8 dana. Kontrolnoj grupi intraperitonealno je aplikovan fiziološki rastvor u dozi od 1 ml/kgTT/ 24 časa. Sve životinje su žrtvovane 9. dana od početka eksperimenta.

Za mikromorfološko ispitivanje isečci jetre eksperimentalne, kao i kontrolne grupe pacova, fiksirani su u 10% rastvoru formaldehida. Nakon rutinske obrade tkiva u autotehnikonu i kalupljenja u parafinu pravljeni su laboratorijski preseći debljine 5 mikrometara. Preseci su bojeni sledećim metodama:

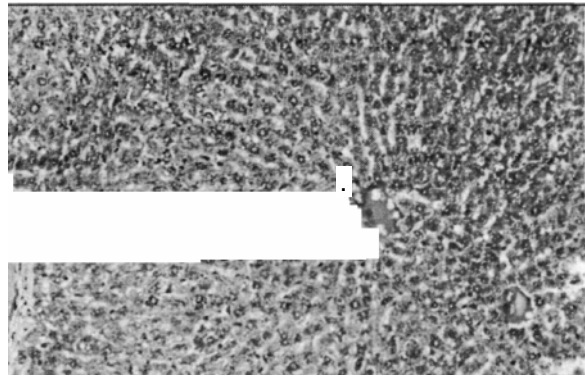
1. Klasična (HE) metoda za ispitivanje histoloških promena.
  2. Histoheimijska metoda za verifikaciju nađenih histoloških lezija i to:
    - PAS - za bojenje deponovanog glikogena.
- Određivanje sadržaja glikogena obavljeno je semikvantitativnom metodom, tako što je njegova normalna količina označavana sa (+++), smanjenje I stepena sa (++), smanjenje II stepena sa (+/-), a potpuno odsustvo sa (-).

### Rezultati rada

#### Analiza jetre kod kontrolne grupe životinja

##### a) Histološke karakteristike jetre

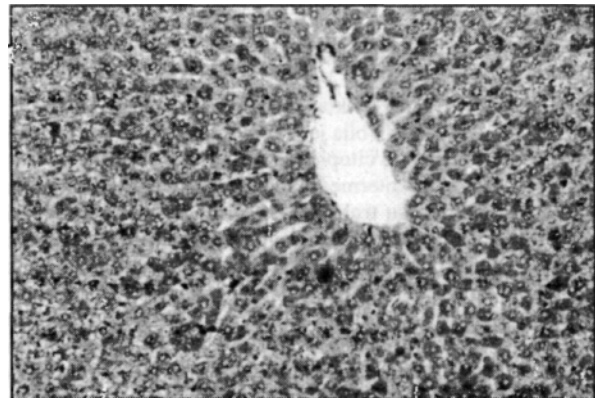
Prisutna je jasna lobularna građa jetre: u centru lobulusa je centralna vena, dok je na periferiji prisutan portalni ili Kiemanov interlobulusni prostor. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra (slika 1). Razlika u građi perivenularne, 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) Histoheimijska detekcija glikogena

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

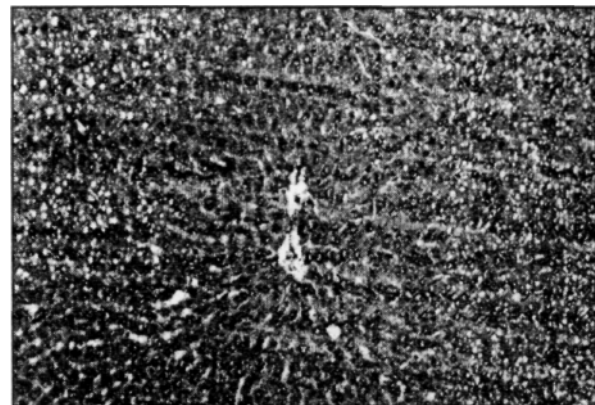


Slika 2. Purpurno crvene guste granule u celjoj citoplazmi hepatocita, PAS x 200

#### Analiza jetre kod eksperimentalne grupe životinja

##### a) Histološke karakteristike jetre

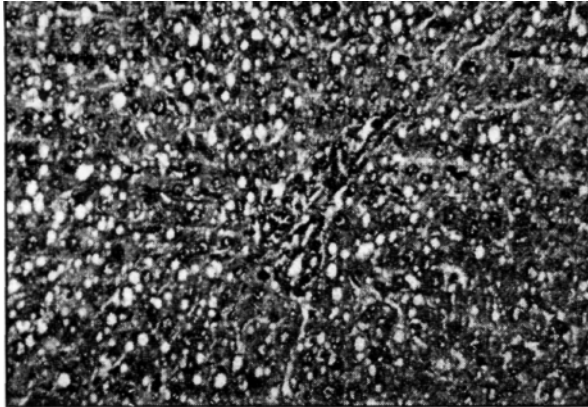
U svim lobulusima jetre promene su skoncentrisane na periportnu i intermedijarnu zonu: u citoplazmi ovih hepatocita nalaze se manje masne kapi koje potiskuju jedro i rub citoplazme ka ćelijskoj membrani. Istovremeno je prisutna retka acidofilna degeneracija hepatocita (slika 3).



Slika 3. Mikrokapljičasta masna promena u hepatocitima periferne i intermedijarne zone, PAS x 100

### b) Histohepijska detekcija glikogena

Redukcija glikogena (+) je proporcionalna distribuciji mikrokapljičaste masne promene (slika 4). U intaktnoj perivenularnoj zoni acinusa glikogen je nađen u većoj količini (++)



Slika 4. Slaba PAS reakcija (+) u hepatocitima sa masnom degeneracijom, PAS x 400

### Diskusija

Intraperitonealna aplikacija gentamicina i enalapрила u određenim dozama pacovima Wister soja u našem eksperimentu izazvala je čitav spektar 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.

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 (4), 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 i reaktivnih zapaljenjskih 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 endoplazmatskog retikuluma (rER).

Na našem eksperimentalnom materijalu najveća zastupljenost histoloških promena u vidu acidofilne degeneracije i mikrokapljičaste masne promene uglavnom je bila prisutna u intermedijarnoj zoni acinusa, mada su ove promene nađene i u periportnoj zoni. 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 aplikovanih doza dalih lekova do ove zone acinusa i ispoljavanja njihovog hepatotoksičnog efekta.

Hepatotoksičnost enalapрила povezana je sa smanjenjem konjugacije sa glutationom. Eksperimentalni radovi i toksikološka ispitivanja (2,3) pokazala su da davanje ovog leka kulturi hepatocita pacova izaziva dozno-zavisno smanjenje glutationa unutar ćelija i gubitak varijabilnosti hepatocita koje nastupa veoma brzo, već nakon 6 do 8 sati. Citotoksičnost enalapril maleata najverovatnije je posledica smanjenja detoksikacionih sposobnosti putem konjugacije sa glutationom. Prema ispitivanjima, pretretman induktorima citohroma P - 450 povećava hepatotoksično delovanje, dok davanje inhibitora ovog enzima smanjuje hepatotoksičnost enalapрила (6).

Potencijalna toksičnost gentamicina ispitivana je preko urinarnog izlučivanja alanin aminopeptidaze kao indikatora potencijalne toksičnosti, hidrosolubilnog metabolita, povećane aktivnosti, koji se izlučuje putem bubrega (7).

Histološke promene kod eksperimentalne grupe pacova uslovile su depleciju glikogena, posebno gde su zastupljene mikrokapljičaste masne promene.

Na našem eksperimentalnom materijalu smanjenje glikogena kod eksperimentalne grupe pacova je proporcionalno stepenu morfoloških promena na hepatocitima. Aplikacija datih lekova dovodi do smanjenja metabolizma glikogena. Zbog toga je smanjenje glikogena najizraženije na hepatocitima gde su promene difuzne sa dominantnim masnim i mikromorfološkim promenama.

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

### Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata iz eksperimentalne i kontrolne grupe životinja, može se zaključiti da gubitak glikogena u depoima jetre označava smanjenje detoksikacione uloge hepatocita, pošto je isti iscrpljen zbog njihove povećane aktivnosti u procesu detoksikacije. Ove promene u sadržaju glikogena bile su proporcionalne distribuciji mikrokapljičaste masne promene uz istovremeno prisustvo acidofilne degeneracije hepatocita. Deplecijom glikogena može se objasniti i proces obnove energije (glikogenoliza) jetrine ćelije potrebne za procese detoksikacije.

Na osnovu dobijenih rezultata komparativnog proučavanja histoloških i histohepijskih promena, može se zaključiti da postoji značajna korelacija između aplikacije gentamicina i enalapрила i navedenih promena. Stoga, autori smatraju da bi pri indikaciji lekova iz grupe antihipertenziva kao što je enalapril 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 an update on Science and Practice. AASLD Chicago 1988; 159-70.
2. Romet J M, Huang H S, Paul C J, Thomas B H. Enalapril cytotoxicity in primary cultures of rat hepatocytes. II. Role of glutathione. *Toxicol* 1991; 58: 269-77.
3. Romet J M, Huang H S, Paul C J, Thomas B H. Enalapril-cytotoxicity in primary cultures of rat hepatocytes. I. Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors. *Toxicol* 1991; 58: 257-67.
4. Correia M A. Drug Biotransformation. In: Katzung B G /ed/. Basic and Clinical Pharmacology. Prentice Hall International Inc San Francisco 1995; 48-59.
5. Craig JR. Liver. In: Kissane J M/ed/. *Anderson's Pathology* CV Mosby Co St Louis-Toronto: 1990; 964-1011.
6. Romet J M Huang H S Enalapril hepatotoxicity in the rat. Effects of modulators of cytochrome P450 and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1803-10.
7. 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.

## HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN THE LIVER OF RATS TREATED BY GENTAMICIN AND ENALAPRIL

*Nenad Stojiljkovic, Dragoljub Jovanovic, Slavimir Veljkovic, Goran Rankovic, Voja Pavlovic, Dragan Radovanovic and Milan Stoiljkovic*

We have examined histological and histochemical changes in the liver of rats treated by Gentamicin and Enalapril.

Using the experimental group of animals (10 rats) treated by Gentamicin in the dosage of 100 mg/kg BW/24<sup>h</sup> and Enalapril in the dosage 1 mg/kg/BW/24<sup>h</sup> during the period of 8 days, it was found that in all lobules of the liver, changes were concentrated around periportal and intermediary zones. In the cytoplasm of these hepatocytes small fatty drops were found, so that they suppressed the nucleus and the borders of cytoplasm towards the cell membrane. Simultaneously, rare acidophilic hepatocyte regeneration was present. Glycogen reduction (+) in the experimental group of rats was proportional to the distribution of the changes characterized by fatty micro-drops. In the intact perivenular zone of acinus, larger quantities of glycogen were found (++) .

In the control group of animals (10 rats) treated by physiological solution (1 ml/kg/BW/24) a clear lobular composition of the liver was present. All hepatocytes were polygonal in shape, their cytoplasm was pink and the localization of their nucleus was central or paracentral. There was no noticeable difference in the form of perivenular, intermediary and periportal zones. Control group hepatocytes were organized trabecularly with sinusoidal capillaries in between, covered with smooth endothelial and Kupfer's cells, characterized by ovoid nuclei and distinctively light nucleoplasm. Glycogen was deposited in the entire cytoplasm in substantial amounts (+++), in the shape of purple-red granules. Glycogen distribution was uniform in all zones.

The histological or micro-morphological changes in hepatocytes caused numerous liver dysfunctions, which primarily included the liver's role in metabolic and detoxication processes. The effects of drugs applied either directly or indirectly (via metabolites created) resulted in degenerative and reactive burn changes. The results of a comparative study of histological, histochemical and biochemical changes point to the conclusion that there is a significant correlation between the application of Gentamicin and Enalapril and the changes mentioned above. *Acta Medica Medianae* 2004; 43 (2): 19-22.

**Key words:** liver, Gentamicin, Enalapril