
Jovana Živković

Histološke i ultrastrukturne promene hepatocita u pacova tretiranih fenobarbitonom

Ispitivan je efekat fenobarbitona na ćelije jetre, kao i uticaj dužine aplikacije na njih. U tu svrhu su Wistar pacovi tretirani fenobarbitonom 7, 14 i 21 dan. Histološka obrada tkiva jetre, koja je usledila nakon tretiranja fenobarbitonom, i bojenje HE i PAS metodama, pokazala je da su ekspanzija promena prema centralnoj veni i portnom prostoru, kao i fokalne ili apoptotične nekrotične promene hepatocita, veoma izražene u grupi tretiranoj 21 dan.

Uvod

Pojedini lekovi indukuju pojačanu biosintezu mikrozosomnih enzima jetre lokalizovanih u membrani agranularnog endoplazmatičnog retikuluma i na taj način pojačavaju metaboličku aktivnost jetre. Primer za takvo induktivno svojstvo su barbiturati (hipnotici) (Cotran 1994a; Varagić 1987). Pojačani metabolizam leka, pri ponovljenoj primeni, dovodi do slabljenja i skraćivanja njegovog dejstva. Time se objašnjava nastanak tolerancije prema barbituratima, tj. potreba za većim dozama, da bi se postigli željeni efekti (Cotran 1994b; Guyton 1973; Katić 1995).

Cilj ovog rada bio je ispitivanje efekta fenobarbitona, leka iz grupe barbiturata, na hepatocite zavisno od dužine njihove aplikacije, i mogućnost da se ustanovi mehanizam tolerancije posle određenog perioda uzimanja fenobarbitona.

Pretpostavljeno je da će se najizraženija hiperplazija endoplazmatičnog retikuluma pojaviti u grupi životinja najduže tretiranih fenobarbitonom.

Materijal i metode

Prvi deo ovog eksperimenta rađen je u Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju na Medicinskom fakultetu u Nišu i trajao je 21 dan. Korišćeno je 12 Wistar pacova, muškog pola, težine 250 g, starosti 4 me-

*Jovana Živković
(1981), Niš,
Božidarčeva 24/5,
učenica 1. razreda
Gimnazije „Bora
Stanković u Nišu*

MENTOR:

*Prof. Dr Vuka Katić,
Medicinski fakultet u
Nišu*

seca. Životinje su bile podeljene u dve grupe: kontrolnu i eksperimentalnu. Eksperimentalnu grupu činilo je devet životinja, a kontrolnu tri. Eksperimentalna grupa je bila podeljena u tri podgrupe (u svakoj po tri životinje). Eksperimentalne životinje su tretirane fenobarbitonom: prva podgrupa – 7 dana, druga podgrupa – 14 dana i treća – 21 dan. Fenobarbiton im je davan oralno preko vode za piće, u dozi od 6 mg/kg (svakom pacovu dnevno po 1.5 mg). Pacovi su brikete (suvu hranu) i vodu dobijali jednom dnevno. Čuvani su pod istim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 20°C. Žrtvovani su dekapitacijom. Za pravljenje preparata uzet je deo većeg režnja jetre koji se, nakon žrtvovanja, čuvao u fiksativu formalinu.

Drugi deo eksperimenta rađen je u IS Petnica. Pravljeni su histološki preparati jetre pacova, da bi mogla da se prati promena broja i veličine glatkog endoplazmatičnog retikuluma u hepatocitima. Nakon fiksacije slede postupci: dehidracija (96% etanolom), prosvetljavanje (ksilolom), kalupjenje (paraplastom), sečenje (mikrotom sa metalnim ili staklenim nožem da preseći tkiva treba da budu 1-5 µm), deparafinizacija (ksilolom). Postoje dve metode bojenja tkiva: klasično – HE (hematoksilin- eozin) i PAS (Periodic-Acid-Schiff) (Petrović *et al.* 1979). HE bojenje se koristi radi proučavanja histoloških promena na hepatocitima (citoplazma ćelija se boji roze, a jedra tamno plavo). Kod PAS bojenja, uočava se da je preparat tamno ljubičast, omogućavajući nam da vidimo glikogen kao tamne tačke u citoplazmi hepatocita.

Rezultati

Makroskopski opis

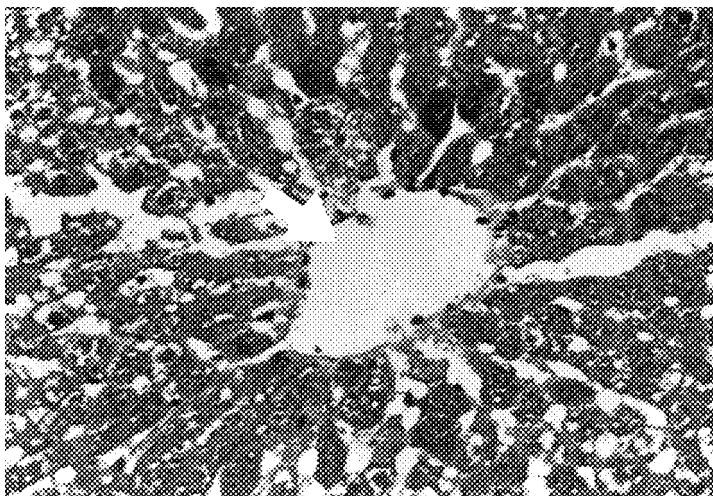
Jetra je nešto bleđa, normalne je veličine i oblika, glatke površine.

Mikroskopski opis

1. **Kontrolna grupa.** Normalna građa jetre se karakteriše gredičastim rasporedom hepatocita u čijem se centru nalazi vena centralis (slika 1 – strelica). Histochemijskim bojenjem na glikogen dokazano je prisustvo velike količine deponovanog glikogena u vidu crvenih granula.

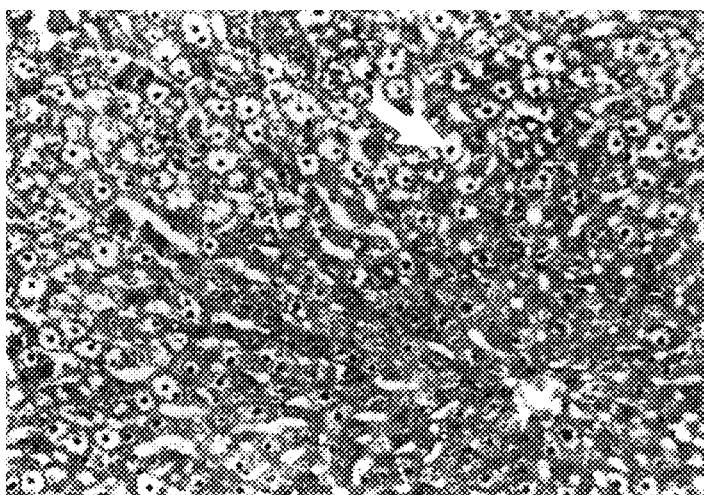
2. **Eksperimentalna grupa.** a) Histološke i histochemijske karakteristike jetre životinja koje su tretirane 7 dana: Početne promene tipa hidropsne degeneracije koja se karakteriše svetlom citoplazmom i centralnom lokalizacijom jedara, nađene su samo u srednjoj zoni lobulusa koji je osnovna histološka jedinica jetre (slika 2 – strelica). Količina glikogena je normalna u centralnim delovima režnjića, a izrazito smanjena u hepatocitima sa „svetlom citoplazmom.

b) Histološke i histochemijske karakteristike jetre životinja koje su tretirane 14 dana: Broj hepatocita sa svetlom citoplazmom i odsustvom glik-



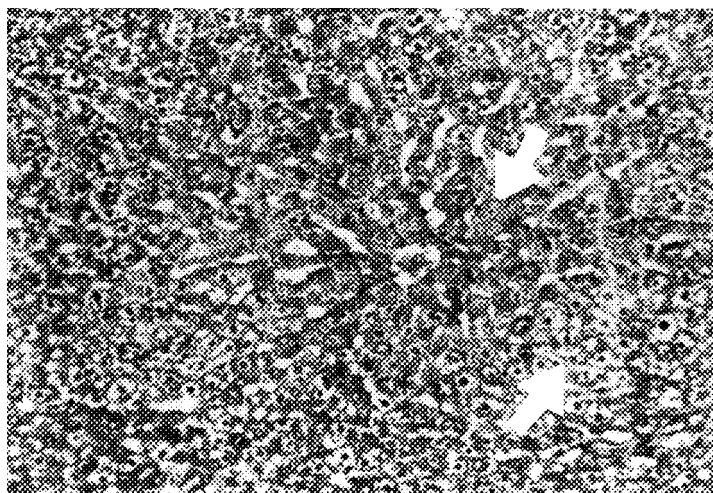
Sl. 1.
Normalna građa
jetre. PAS \times 300

Figure 1.
Normal structure of
the liver.



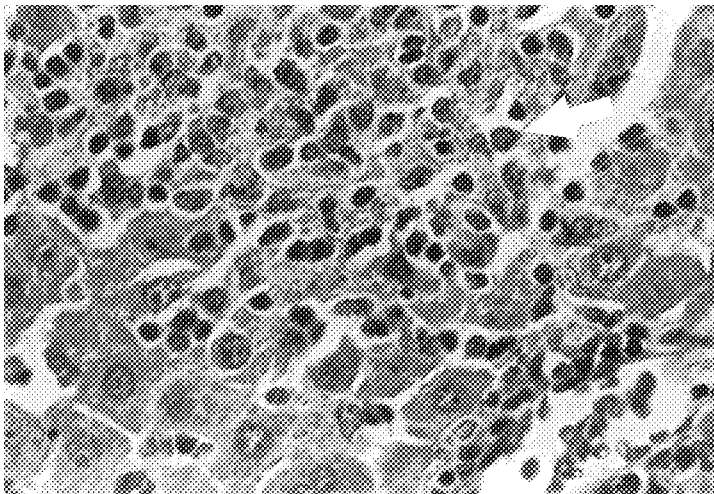
Sl. 2.
Hidropsna promena u
intermedijarnoj zoni.
PAS \times 250

Figure 2.
Hydropic change in
the middle zone.



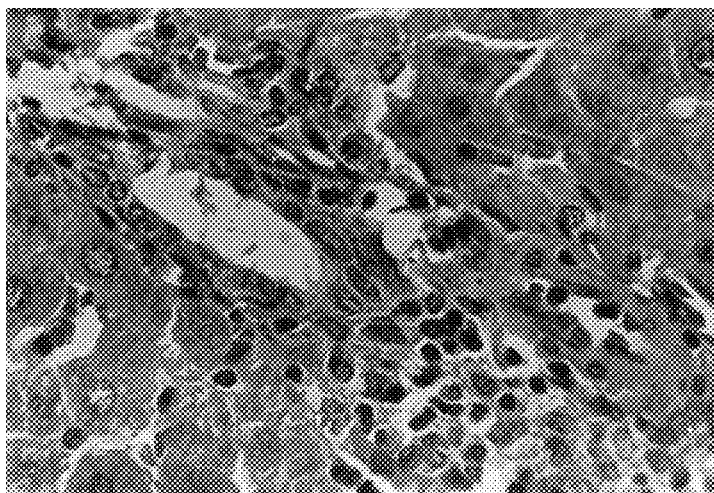
Sl. 3.
Prisustvo „svetlih
hepatocita u centralnoj
zoni. PAS \times 250.

Figure 3.
Presence of the "light"
hepatocytes in the
central zone.



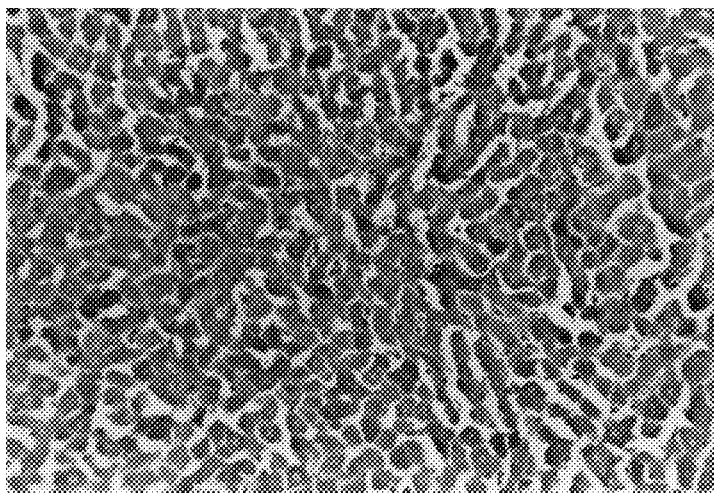
Sl. 4.
Ćelije zapaljenja u predelu perivenularne nekroze. HE × 300

Figure 4.
Cells of inflammation localised toward central vein necrosis.



Sl. 5.
Ćelije zapaljenja u predelu portnog prostora. HE × 250

Figure 5.
Cells of the inflammation in the portal



Sl. 6.
Apoptoza i hipogranulacija glikogena duž celog reznjica. PAS × 250.

Figure 6.
Apoptotic changes and hypogranulation of the glycogen in whole liver slice.

ogena je izrazito povećan. Naime, kako u srednjoj tako i u pericentralnoj zoni reznjića hepatociti sadrže svetlu citoplazmu i centralno postavljeno jedro (slika 3 – strelice).

c) Histološke i histoemijske karakteristike jetre životinja koje su tretirane 21 dan: Najveće promene su nađene u ovoj eksperimentalnoj grupi. Pored svetle citoplazme koja je prisutna u hepatocitima svih zona, zapaženo je i izumiranje (nekroza) kako čitave grupe hepatocita, tako i pojedinačnih ćelija. Drugim rečima, fokusi nekroze se ogledaju zamenom hepatocita umnoženim ćelijama zapaljenja: limfocitima, plazmocitima, leukocitima i makrofagama (slika 4 – strelica). Polja nekroze su prisutna i u perifernim delovima reznjića (oko portnog prostora). U hepatocitima koji su manjih dimenzija i nemaju jedra, količina glikogena je takođe smanjena ili ga nema. Ovo ukazuje na prisustvo nekroze i pojedinačnih ćelija, što je poznato kao apoptoza ili programirana smrt ćelija (slika 6).

Diskusija

U okviru opštih patoloških mehanizama koji su posledica povećane funkcije ćelija ili nekih njenih organela, poznata je hiperplazija glatkog endoplazmatičnog retikuluma. Ona se karakteriše cističnom dilatacijom (proširenjem), kao i njegovim otokom, što uslovljava mikroskopsku sliku „svetle citoplazme hepatocita. Ovakav umnožen retikulum će svoj metabolički zadatak, tj. razgradnju barbiturata, izvršiti za kraći vremenski period. Stoga je i razumljiva potreba za sve većim dozama barbiturata, da bi se postigao prvobitni željeni efekat. Hiperplaziju glatkog endoplazmatičnog retikuluma, na elektronskom mikroskopu, opisali su i drugi autori (Jones 1996). Međutim, njihovi eksperimenti su bili kratki, a nije ni bilo uporednog proučavanja efekta fenobarbitona, zavisno od dužine aplikacije.

U nama dostupnoj literaturi nismo našli na teške, tj. toksične nekrotične efekte na hepatocite, što je interesantno zapažanje u hepatocitima naše treće eksperimentalne grupe. Da bi se potvrdio i toksični efekat barbiturata na hepatocite, nakon njegove duge upotrebe, potrebna su dalja istraživanja, kako eksperimentalna, tako i na humanom materijalu.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Upotreba barbiturata ima efekte na hepatocite.
2. Efekti se ogledaju u povećanom broju tj. vakuolizaciji citoplazme hepatocita.
3. Najveće promene (promene duž celog reznjića) prisutne su nakon dužeg unošenja barbiturata.

4. Iz rezultata koji su dobijeni upoređivanjem hepatocita kontrolne i eksperimentalne grupe, proističe da je tolerancija neznatna posle nedelju dana uzimanja fenobarbitona, da je izraženija posle dve nedelje uzimanja, kao i da je najočiglednija nakon tronedeljnog konzumiranja ovog leka.
5. Fenomen tolerancije na barbiturate može se objasniti povećanim brojem i povećanom funkcijom glatkog endoplazmatičnog retikuluma.

Zahvalnost: Dr Vuki Katić, Institutu za patologiju i Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Literatura

- Cotran, R.S. 1994a. Cellular injury and Cellular death. In *Pathologic basis of disease* (ed. R.S. Cotran, V. Cumar, S.L. Robbins). Philadelphia: WB, Saunders, pp. 1-34.
- Cotran, R.S. 1994b. Environmental and Nutritional Diseases. In *Pathologic basis of disease* (ed. R.S. Cotran, V. Cumar, S.L. Robbins). Philadelphia: WB, Saunders, pp. 379-430.
- Guyton, A. 1973. *Medicinska fiziologija*. Beograd: Medicinska knjiga.
- Jones, A.L.N., Pawcett, D.W. 1996. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. *Journal of Histochemistry and Chitochemistry*, 14: 215.
- Katić, V. 1995. *Virusni hepatitisi*. Niš: Prosveta.
- Petrović, J., Savić, A., Šerban, N. 1979. *Specijalni biološki praktikum*. Beograd: Naučna knjiga.
- Varagić, V.M., Milošević, M.P., 1987. *Farmakologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga.
-

Jovana Živković

Histological and Ultrastructural Changes of Hepatocite of Rats treated by Phenobarbital

One of the most common complication caused by long term use of barbiturates (hypnotic) is being accustomed to them. It means higher doses in order succeed wanted effects. In spite of the fact that mechanism of the tolerance (accustomed) on hypnotic is much reported, data are adversative, because the term, long-term use is not stated priceless. As of mentioned dilemma we have put the following aim in this work:

1. What are phenobarbital effects on liver cells, and
2. How much influence has duration of application on these cells.

Experimental animals, i. e. white rats 4 months old, weight of 250 g, were tested. They were divided in two groups: control and experimental group. Control group animals were kept on the same temperature, fed and watered on the same way as the animals from experimental group, but not treated by phenobarbital. Experimental group was treated in the period of 7, 14, 21 day by therapy doses of phenobarbital (6 mg/kg) in drinking water, once per day.

After the end of experiment, the animals were sacrificed and liver tissue was taken and fixed in 10% formaldehyde, hand processed and molded in paraplast. Cuttings thickness of 5 micrometers were dyed with HE and PAS methods.

The earliest changes (after 7 days) type of microvesicular, localized excessively in the middle zone of liver slice. Concerning the other two experimental groups, it was noticed some expansion change toward central vein and also (treated in the period of 21 day) were found focal or apoptotic necrotic changes of hepatocyte.

This work discusses the role of hyperplasia of smooth endoplasmic reticulum (responsible for decomposition of phenobarbital) presented by vesicular and hydropic histological transformations responsible for phenomena of Rsumtolerance on hypnotic shistological appearing.

