

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Irena Królikowska-Prasal

Tamara MAJEWSKA, Maria MATYSEK, Adam MILIK

Badania histologiczne i histochemiczne nad wpływem Furosemidu na wątrobę szczura

Гистологические и гистохимические исследования влияния фуросемида на печень крысы

Histological and Histochemical Studies on the Effect of Furosemide on the Rat Liver

Największą ilościowo grupę substancji egzogennych inaktywowanych w wątrobie stanowią leki (1, 7, 10). Jednym z nich, ulegającym katabolicznej degradacji w hepatocytach, jest Furosemid (kwas 4-chloro-N(2-furylometylo)-5-sulfamylantranilowy), jeden z najbardziej skutecznych i, jak sądzono, najmniej toksycznych środków moczopędnych (2, 4, 5, 8, 9, 11). Według piśmiennictwa wątroba może zmetabolizować ok. 1 g Furosemidu w ciągu 2 godz., w wyniku tego pierścieni furanowy cząsteczki tego związku podlega aktywacji polegającej na powstaniu nadtlenu (12), trudno więc wykluczyć potencjalną hepatotoksyczność tego leku. Dotyczy to zwłaszcza tych chorych z ostrą lub przewlekłą niewydolnością nerek, u których dawki sięgają do 2000 mg podanych w ciągu 30 min. Należy jednak podkreślić, że nawet wówczas wątroba zapewnia metabolizowanie do 98% tego saluretyku (8, 12).

Furosemid jest szeroko stosowany w praktyce klinicznej, choć od lat siedemdziesiątych zaczęto zwracać uwagę na toksyczny wpływ tego leku na metabolizm wątroby. Ze względu na to postanowiono przebadać metodami: histologiczną i histochemicznymi wpływ tego związku na morfologię i czynność enzymatyczną hepatocytów zwierząt doświadczalnych po zwiększonej w porównaniu z przeciętną, stosowaną u ludzi, dawce preparatu.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach białych, samicach rasy Wistar, o m.c. ok. 330 g, które podzielono na 3 grupy: dwie doświadczalne i jedną kontrolną.

Zwierzęta grupy I doświadczalnej otrzymywały przez 7 kolejnych dni po 40 mg preparatu Furosemid dożołądkowo przed porannym karmieniem. Po tym okresie poddawano je obserwacji przez dalszych 7 dni. Zwierzęta grupy II doświadczalnej otrzymywały takie same dawki leku przez 7 dni, natomiast szczurom kontrolnym podawano po 2 cm³ rozpuszczalnika (wody destylowanej)

w takich samych terminach jak zwierzętom grup doświadczalnych. Każde zwierzę doświadczalne otrzymało łącznie 280 mg leku, tzn. 0,835 g/kg. Po upływie doby od otrzymania ostatniej dawki zwierzęta dekapitowano, a następnie pobierano do badań wycinki wątroby. Materiał utrwalano w płynie Bakera bądź w płynie Carnoy. Skrawki barwiono metodą z hematoksyliną i eozyną oraz stosowano testy histochemiczne do wykazania aktywności: fosfatazy kwasnej (metodą Gomoriego), adenozynotrójfosfatazy (metodą Wachsteina i Meisel), glukozy-6-fosfatazy (metodą Wachsteina i Meisel) oraz glikogenu (metodą PAS według McManusa).

WYNIKI

Barwienie hematoksyliną i eozyną (H + E)

W wątrobie zwierząt grupy I doświadczalnej obserwowano, oprócz normalnie zachowanych zrazików, wiele obszarów patologicznie zmienionych — martwiczych, lokalizujących się głównie przy żyłach środkowych. Naczynia włosowate zatokowe poszerzyły się. Liczne hepatocyty zmniejszyły lub powiększyły swoje rozmiary. Również komórki Browicza-Kupffera uległy znacznemu powiększeniu (ryc. 1 i 2).

W mięszu wątroby szczurów grupy II doświadczalnej większość zrazików przypominała obraz kontrolny, jednak i tutaj zaczęły pojawiać się zmiany strukturalne (ryc. 3).

Fosfataza kwasna (Fk)

W porównaniu z wątrobą zwierząt kontrolnych, gdzie umiarkowanie intensywny, ziarnisty odczyn był zlokalizowany w pobliżu kanalików żółciowych, aktywność u zwierząt grupy I doświadczalnej zwiększyła się, obejmując całą cytoplazmę (szczególnie przy żyłach środkowych) oraz komórki Browicza-Kupffera (ryc. 4 i 5). W hepatocytach szczurów grupy II doświadczalnej odczyn na Fk był mniejszy niż w skrawkach kontrolnych, jedynie niektóre komórki Browicza-Kupffera wykazywały silne zabarwienie (ryc. 6).

Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza)

W wątrobie zwierząt kontrolnych aktywność tego enzymu związana była z kanalikami żółciowymi i ścianami naczyń krwionośnych (ryc. 7). W grupie I doświadczalnej intensywność zabarwienia zwiększyła się, obejmując również wakuole Kupffera (ryc. 8). W skrawkach z wątroby zwierząt grupy II doświadczalnej obraz zrazików wątrobowych przedstawiał się dwojako: większość przypominała obraz grupy kontrolnej, niektóre zaś obraz grupy I doświadczalnej (ryc. 9).

Glukoza-6-fosfataza (G-6-P-aza)

W hepatocytach zwierząt grupy kontrolnej i obu grup doświadczalnych obraz aktywności enzymu był podobny. Barwne ziarnistości wypełniały cytoplazmę, szczególnie przy kanalikach żółciowych. Obwodowe strefy zrazików wykazywały odczyn silniejszy.

Glikogen

Zarówno w wątrobie zwierząt kontrolnych, jak i grupy II doświadczalnej obserwowano podobną lokalizację ziarnistości PAS-dodatnich. Komórki z mniejszą i większą ilością glikogenu tworzyły typową mozaikę. W hepatocytach szczurów grupy I doświadczalnej odczyn był znacznie silniejszy, przeważnie jednak dyfuzyjny. Miejsca zmienione patologicznie wykazywały słabą aktywność (ryc. 10, 11 i 12).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W latach siedemdziesiątych zaczęły pojawiać się doniesienia o ubocznych skutkach stosowania Furosemidu, z których najczęściej wymieniana była hepatotoksyczność (7, 8, 12). Według Mitchella i wsp. (8) ten szeroko stosowany lek, przetwarzany jest przez enzymy mikrosomalne w wątrobie w reaktywny metabolit, powodujący martwicę komórek wątrobowych. Podawany kobietom ciężarnym może spowodować wady rozwojowe płodu, a w połączeniu z innymi lekami (np. z Cephaloridine) — prowadzić do uszkodzenia nerek. Wątroba ma duże zdolności regeneracyjne. Według Krusia (6) u człowieka po 10–20 dniach uszkodzony narząd osiąga prawidłowe wymiary. Także u zwierząt dzieje się podobnie (8).

W naszych badaniach obraz mikroskopowy wątroby szczurów po 7 dniach podawania Furosemidu przypominał na ogół narząd kontrolny, choć u niektórych zwierząt zaczęły pojawiać się niewielkie obszary strukturalnie zmienione. Wydawało się, że po tygodniowej przerwie w podawaniu leku (grupa I) miąższ wątroby wróci do stanu wyjściowego; okazało się jednak, że u wszystkich badanych zwierząt tej grupy zmiany martwicze powiększyły się. Sądzymy zatem, zgodnie z sugestią Mitchella i wsp. (8), że uszkodzenie wątroby spowodowane było raczej przez metabolity Furosemidu, powstałe w hepatocytach, niż przez sam lek.

Zastosowane testy histochemiczne również wykazywały zróżnicowanie. U szczurów grupy II doświadczalnej Fk wykazywała w wątrobie słabszą aktywność niż w obrazach kontrolnych, natomiast znacznie zwiększona reakcja, zarówno w hepatocytach, jak i komórkach Browicza-Kupffera, występowała

u zwierząt grupy I doświadczalnej. Podany lek spowodował zatem początkowo działanie hamujące czynność lizosomów, a dopiero po zakończeniu jego podawania, gdy wystąpiła martwica wielu komórek, zwiększyła się aktywność enzymatyczna lizosomów, związana z usuwaniem zużytych składników komórkowych i metabolitów badanego związku (12).

ATP-aza także wykazywała zwiększony odczyn u szczurów grupy I doświadczalnej, zwłaszcza w wakuolach Kupffera. Wiąże się to z wydalaniem Furosemidu z żółcią (9). Zmiana aktywności tego enzymu zależy między innymi od substancji działającej na komórkę (3).

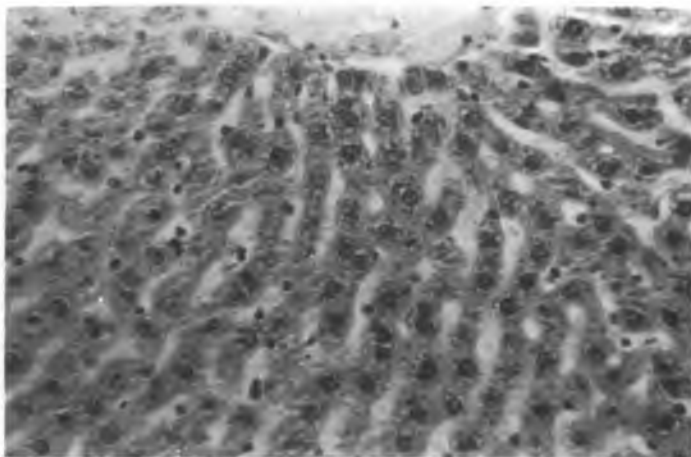
Brak wyraźnych zmian w aktywności G-6-P-azy w grupach doświadczalnych sugeruje, że podawany lek nie wpływa na zmianę procesów metabolicznych w wątrobie, związanych z regulacją poziomu cukru we krwi.

Zmiany aktywności glikogenu dotyczyły przede wszystkim obszarów martwiczych w doświadczalnej wątrobie. W hepatocytach sąsiadujących z tymi obszarami obserwowano zwiększoną reakcję dyfuzyjną, co świadczyć może o przyspieszonej syntezie glikogenu.

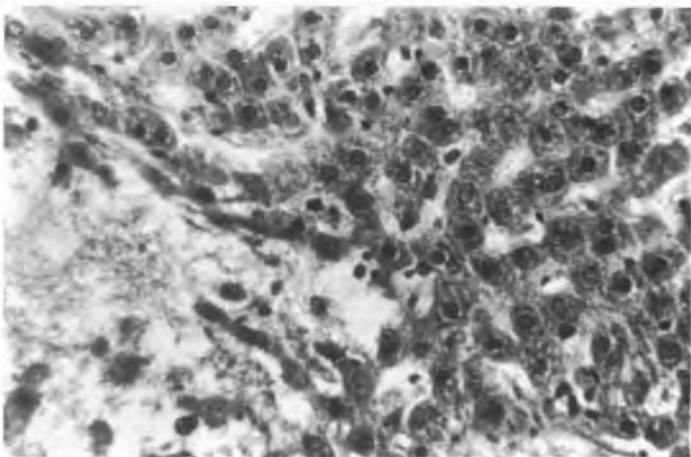
Biorąc pod uwagę powyższe dane sądzimy, że podawanie dużych dawek Furosemidu może spowodować zmiany w metabolizmie komórek wątrobowych oraz zmiany martwicze w wątrobie, utrzymujące się przez pewien okres, nawet po zaprzestaniu podawania leku.

PIŚMIENNICTWO

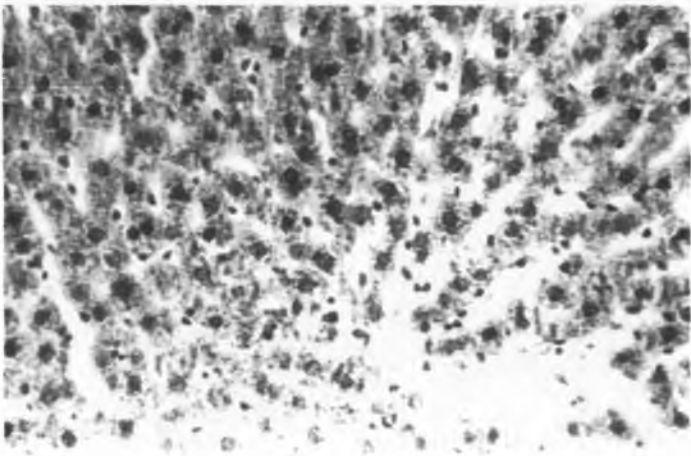
1. Brzozowski R.: Choroby wątroby i dróg żółciowych. PZWL, Warszawa 1983.
2. Dyk T.: Duże dawki Furosemidu w przypadku opornych obrzęków. *Wiad. Lek.* **4**, 347, 1974.
3. Hoń S., Chang I. P.: Histochemical Study by Adenosine Triphosphatase in Cytoplasm. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 71, 1963.
4. Kędra S., Sikorska W. K.: Leczenie Furosemidem nadciśnienia. *Pol. Tyg. Lek.* **24**, 975, 1977.
5. Korzon M., Mrzygodłowiec A.: Zastosowanie Furosemidu w leczeniu ostrej niewydolności nerek w przebiegu zapalenia kłębków nerkowych u dzieci. *Wiad. Lek.* **5**, 449, 1986.
6. Kruś S.: Patomorfologia wątroby. PZWL, Warszawa 1986.
7. McSvenn R. N. M. i wsp.: *Pathology of the Liver*. Churchill Liv., Edinburgh 1979.
8. Mitchell J. R. i wsp.: Hepatic Necrosis Caused by Furosemide. *Nature* **39**, 1529, 1977.
9. Prandota J., Witkowska M.: Farmakologia kliniczna Furosemidu. *Pol. Tyg. Lek.* **39**, 1529, 1977.
10. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A.: *Leki współczesnej terapii*. PZWL, Warszawa 1985.
11. Rancewicz Z., Rawińska D.: Leczenie ostrej niewydolności nerek dużymi dawkami Furosemidu „Polfa”. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2**, 187, 1972.
12. Weihe M. i wsp.: Mechanism of Dose Thershold for Furosemide Hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **29**, 90, 1974.



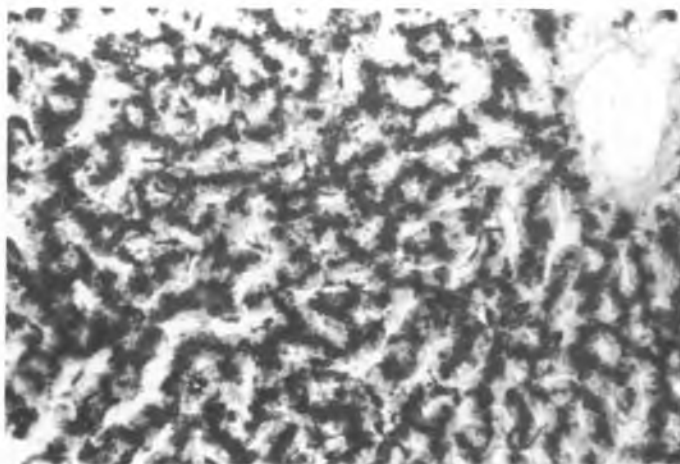
Ryc. 1



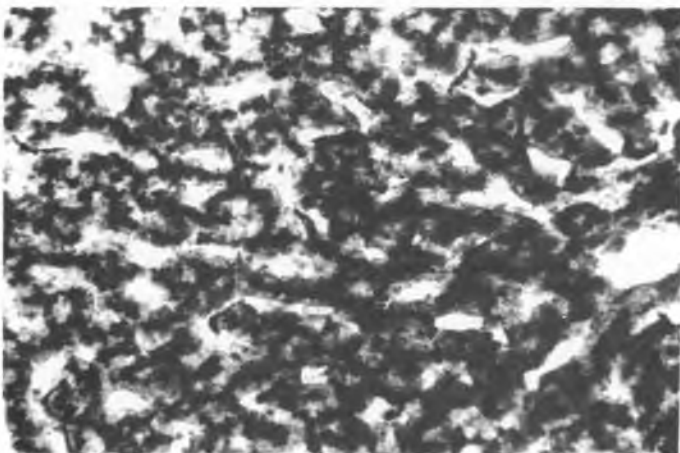
Ryc. 2



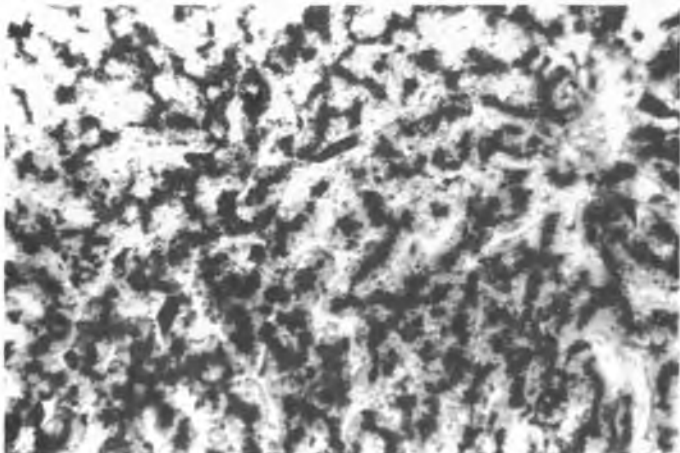
Ryc. 3



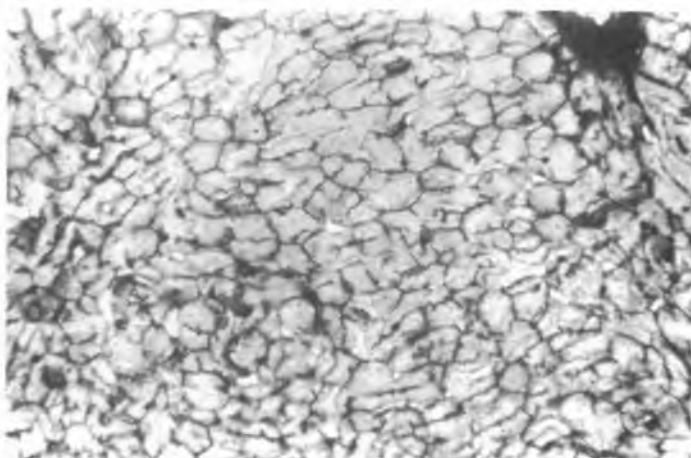
Ryc. 4



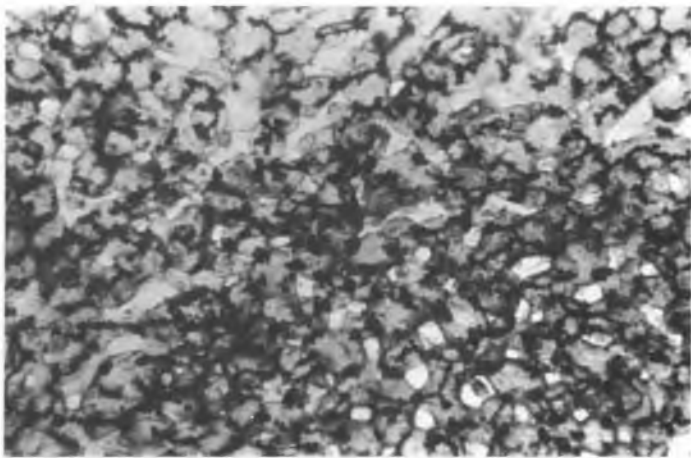
Ryc. 5



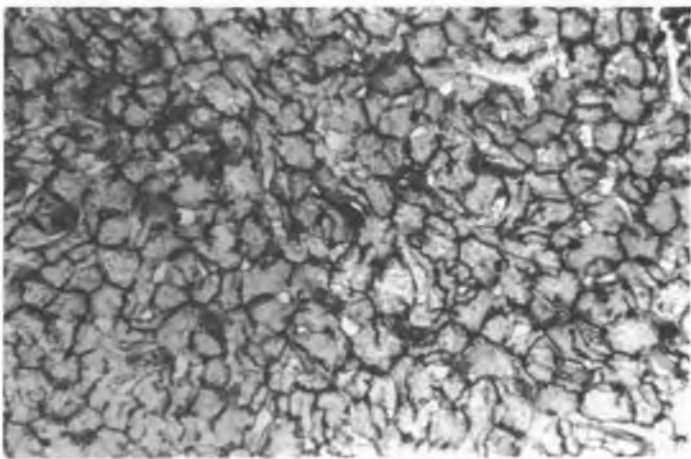
Ryc. 6



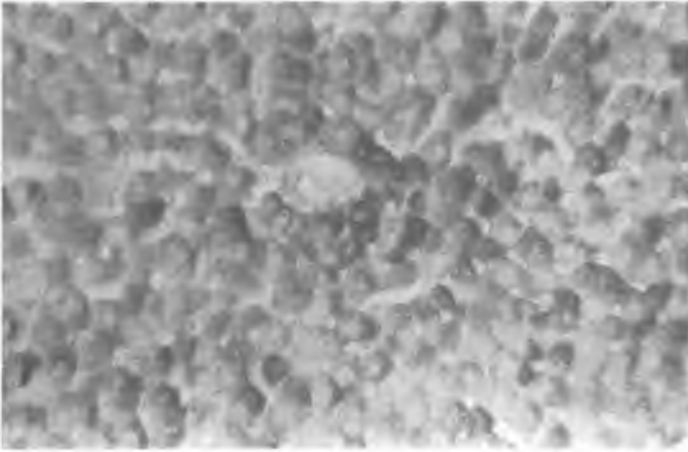
Ryc. 7



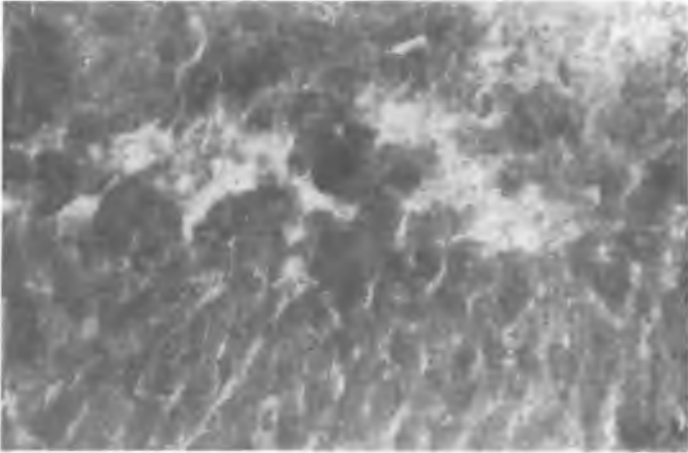
Ryc. 8



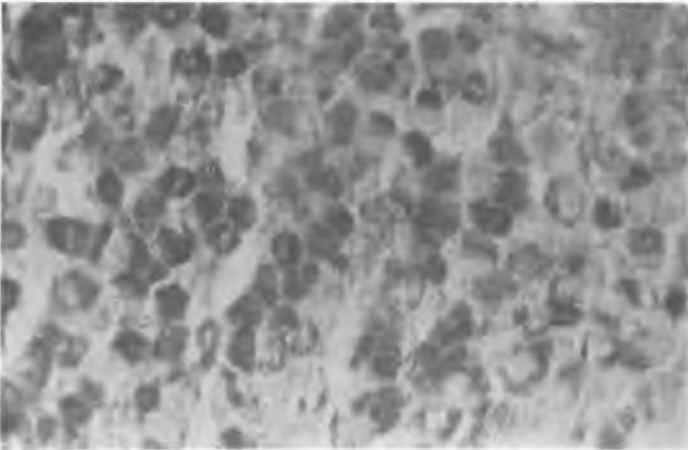
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Wątroba szczura grupy kontrolnej. H + E. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 2. Wątroba szczura grupy I doświadczalnej. H + E. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 3. Wątroba szczura grupy II doświadczalnej. H + E. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 4. Aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie szczura kontrolnego. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 5. Aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 6. Aktywność fosfatazy kwaśnej w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 7. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura kontrolnego. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 8. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura grupy I doświadczalnej. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 9. Aktywność ATP-azy w wątrobie szczura grupy II doświadczalnej. Metoda Wachsteina i Meisel. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 10. Wątroba szczura kontrolnego. Reakcja na glikogen według McManusa. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 11. Wątroba szczura grupy I doświadczalnej. Reakcja na glikogen według McManusa. Pow. ok. 200 ×.

Ryc. 12. Wątroba szczura grupy II doświadczalnej. Reakcja na glikogen według McManusa. Pow. ok. 200 ×.

РЕЗЮМЕ

Доказано, что после подачи белым крысам увеличенной дозы фуросемида появились некротические изменения в печени, особенно у животных, которые после 7-дневной подачи лекарства во время последующих 7 дней лекарства не получали. Отмечено также, что увеличивалась активность кислой фосфатазы, аденозин-три-фосфатазы и гликогена. Изменений в активности глюкозо-6-фосфатазы авторы не наблюдали.

SUMMARY

It was demonstrated that after white rats have been given a higher dose of Furosemide, necrotic changes were found in the liver, particularly in animals which did not receive the drug for 7 days following a 7-day Furosemide treatment. An increase in the activities of acid phosphatase, adenosine-triphosphatase and glycogen was also reported. Changes in the activity of glucose-6-phosphatase were not observed.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Liver rat of control group. H + E. Magn. ca 200 ×.

Fig. 2. Liver rat of experimental group I. H + E. Magn. ca 200 ×.

Fig. 3. Liver rat of experimental group II. H + E. Magn. ca 200 ×.

Fig. 4. Acid phosphatase activity in liver rat of control group. Gomori's method. Magn. ca 200 ×.

Fig. 5. Acid phosphatase activity in liver rat of experimental group I. Gomori's method. Magn. ca 200 ×.

Fig. 6. Acid phosphatase activity in liver rat of experimental group II. Gomori's method. Magn. ca 200 × .

Fig. 7. ATP-ase activity in liver rat of control group. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 200 × .

Fig. 8. ATP-ase activity in liver rat of experimental group I. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 200 × .

Fig. 9. ATP-ase activity in liver rat of experimental group II. Wachstein's and Meisel's method. Magn. ca 200 × .

Fig. 10. Liver rat of control group. Reaction to glycogen by McManus. Magn. ca 200 × .

Fig. 11. Liver rat of experimental group I. Reaction to glycogen by McManus. Magn. ca 200 × .

Fig. 12. Liver rat of experimental group II. Reaction to glycogen by McManus. Magn. ca 200 × .