

Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Hepatosellüler Harabiyetin Önlenmesinde Verapamil'in Etkisi

Dr. Nadir KAYA, Dr. Hakan BOYUNAĞA, Dr. Bedri KANDEMİR, Dr. Sait KAPICIOĞLU

Özet: Bu çalışmada, ratlarda karbon tetraklorür (CCl_4) ile oluşturulan karaciğer harabiyetinde, bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin (VP) koruyucu etkisi araştırıldı. Çalışmaya 4 grup rat alındı. A ve B grubu ratlara 1ml. serum fizyolojik (SF), C ve D grubu ratlara eşit miktarda VP 25mgr. kg intraperitoneal (i.p.) verildi. 1 saat sonra A ve C grubuna 1ml.SF, B ve D grubuna 1ml/kg. CCl_4 %100 i.p verildi. Son işlemten 6 saat sonra ise A ve B grubu ratlara 1ml. SF, C ve D grubu ratlara eşit miktarda VP 25mgr./kg i.p. olarak verildi. 24 saat sonra tüm ratlardan kan örnekleri alınarak serum enzimleri (SGOT=Serum glutamik oksaloasetik transaminaz, SGPT=Serum glutamik piruvik transaminaz) çalışıldı, karaciğerleri çıkarılarak histopatolojik değerlendirme yapıldı.

A (kontrol) ve C(VP verilen) gruplarda serum enzimleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlendi. B grubu (CCl_4) ile kontrol grubu ($p<0,001$) ve D grubu (VP+ CCl_4) ile kontrol grubu ($p<0,001$) arasında anlamlı farklılık saptandı. B ve D grupları serum enzimleri karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi ($p<0,001$).

Histopatolojik değerlendirmede; A ve C grubu ratlarda normal karaciğer doku örnekleri izlendi. Skorlar arası fark anlamlı değildi. B ve D grubu ratların karaciğer doku örneklerinin incelenmesinde sentrizonal alanda yaygın nekroz, iltihabi hücre infiltrasyonu, granüler, vakuoler dejenerasyon, bulanık şişme, "balooning dejenerasyon" tanımlandı. A grubu ile B ($p=0,0001$, $\chi^2=16,00$) ve D ($p=0,004$, $\chi^2=13,00$) grupları skorlamaları arası fark anlamlı bulundu. B ve D grup skorlamaları arası fark ise anlamsızdı.

On dokuz Mayıs Ü.Tıp Fak.
İç Hastalıkları Anabilim Dalı, SAMSUN.

Sonuçlarımız hepatotoksik ajanlarca oluşturulan karaciğer hücre harabiyetinin gelişmesinde Ca^{2+} un önemli bir rol oynadığını, bu harabiyetin ise Ca^{2+} kanal blokörleri ile sınırlandırabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Verapamil, Karbon tetraklorür, Karaciğer harabiyeti.

Summary: PROTECTIVE EFFECT OF VERAPAMIL ON CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED LIVER INJURY IN RATS

In this study, the protective effect of verapamil (VP), a calcium channel blocker, was investigated on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in rats.

The animals were divided into four groups. 1ml. serum physiologic (SP) was given to the groups A and B, an equivalent amount of VP 25mgr/kg. was given to the groups C and D intraperitoneally (i. p. One hour later, 1ml. SP to the groups A and C, 1ml./kg. CCl_4 %100 to the groups B and D were given i.p. 6 hours after the last procedure, 1ml. SP to the groups A and B, an equivalent amount of VP 25mg kg.to the groups C and D were given i.p.24 hours later, blood samples were taken from all of the rats and SGOT (serum glutamate oxalo-acetate transaminase), SGPT (serum glutamate pyruvate trasaminase) levels were measured and microscopic examinations were done removing their liver.

No significant difference was found between the transaminases of the groups A and C. There was a significant difference between the transaminase levels of groups A and B ($p<0,001$) and groups A and D ($p<0,001$) and groups B and D ($p<0,001$).

On microscopic examinations; we found normal liver tissue samples in the groups A and C and there was no significant difference between the scores of the groups A and C. Centrizonal necrosis, fatty degeneration, inflammatory cell infiltration, "balooning degeneration" was determined in the groups B and D. Significant difference were found between the scores of the groups B and D. Our results suggest that calcium plays an important role on liver injury induced by hepatotoxic agents and this injury might be limited by calcium channel blockers.

Key Words: Verapamil, Carbon tetrachloride, Liver injury.

DNA transkripsiyon ve replikasyonu, sitoskeletal regülasyon, fosfolipid, protein turnoverındaki değişimler, enzim bağımlı yolların regülasyonu gibi birçok hücreyel olay serbest sitozolik kalsiyum tarafından düzenlenmektedir (1).

Sitozolik kalsiyum, ekstrasellüler ve intraretiküler kompartmanlarla (10^{-2} mM) karşılaştırıldığında hücre içinde çok düşük düzeydedir (10^{-7} mM) (2). Kalsiyum homeostazındaki değişimler hepatosellüler harabiyetin oluşmasında ve hücre ölümünde rol oynar, artmış hücre içi kalsiyum, harap olmuş hücre membranında aşırı iyon akımına ve hücre depolarının değişmesine yol açarak hücre ölümünü oluşturur (3,4).

Bir hepatotoksik ajan olan karbon tetraklorür (CCl_4), karaciğer hücresi endoplazmik retikulumunun kalsiyum sekestrasyon aktivitesini bozarak sitozolik kalsiyum artışına yol açar (5,6). Artmış hücre içi kalsiyum serbest oksijen radikallerince oluşturulan hücre harabiyetini potansiyalize eder (7,8), mitokondrial ATP sentezini azaltır, Ca^{2+} -ATPaz enzimini aktive eder, ve sonuçta enerji rezervi azalan hücre ölür (1).

Kalsiyum kanal blockerleri ile kalsiyumun hücre içine akımının önlenmesi hepatositleri harabiyete karşı korumaktadır (5,8,9). Bu

ilaçlar L-tip voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek sitoprotektif etki gösterirler. Ayrıca antioksidan (7), kan akımını düzenleyen (5) ve inflamasyona yol açan mediatörleri antagonize eden etkileri de (1) sitoprotektif özelliklerini oluşturur.

Çalışmamız, bir kalsiyum kanal blokleri olan verapamilin, CCl_4 verilen ratlardaki hepatosellüler harabiyetin önlenmesindeki rolünün araştırılması amacıyla planlandı.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada ağırlıkları 160-200gr. arasında değişen ratlar kullanıldı. 16 saat süre ile aç bırakılan hayvanların sadece su içmelerine izin verildi. Sabah saat 09.00'da çalışına başlatıldı. Ratlar 8'erli 4 gruba ayrıldı.

A ve B grubu ratlara 1ml. serum fizyolojik (SF), C ve D grubu ratlara eşit miktarda verapamil (VP) (İsoptin-CIBA) 25mgr. kgr (5,9) intraperitoneal (i.p) verildi. 1 saat sonra A ve C grubuna 1ml. SF, B ve D grubuna 1ml/kg. CCl_4 %100 (Merck) (10,11) i.p verildi. Son işlemden 6 saat sonra ise A ve B grubu ratlara 1ml. SF, C ve D grubu ratlara eşit miktarda VP 25mgr./kgr i.p. olarak verildi (5,9) (Tablo I). 24 saat sonra tüm ratlardan eter anestezisi altında 2ml. kan alınarak (intrakardiyak) serum enzimleri (SGOT= Serum glutamik oksaloasetik transaminaz, SGPT= Serum glutamik piruvik transaminaz) çalışıldı (10-16), karaciğerleri çıkarılarak gruplardan habersiz patolog tarafından histopatolojik değerlendirme yapıldı. Grupların skorlaması Tablo II'de görüldüğü şekilde belirlendi. Gruplar arası serum enzimlerinin karşılaştırmalarında student t-testi, histopatolojik skorların karşılaştırmalarında ise çok gözlü KiKare testi kullanıldı.

SONUÇLAR

Gruplara ait SGOT, SGPT değerleri Tablo III'de verilmiştir. Görüldüğü gibi A grubunda SGOT: 129+25, SGPT:64+6, B grubunda SGOT: 1903+239, SGPT:1900+197, C grubun-

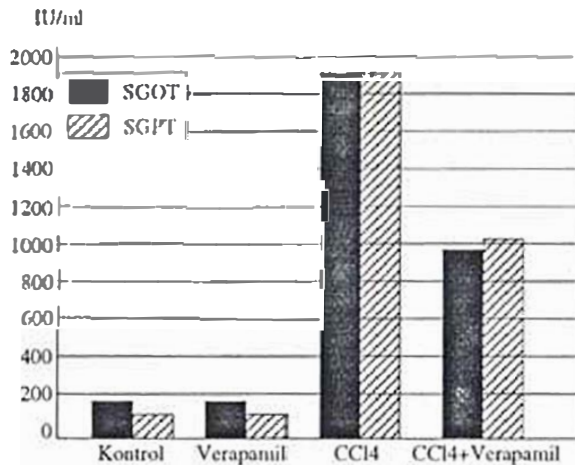
Tablo I: Çalışma grupları.

Saat	A/i.p	B/i.p	C/i.p	D/i.p
09.00	1ml. SF	1ml. SF	VP (25mgr/kg)	VP (25mgr/kg)
10.00	1ml. SF	1ml/kg.CCl ₄	1ml. SF	1ml/kg.CCl ₄
16.00	1ml. SF	1ml. SF	VP (25mgr/kg)	VP (25mgr/kg)

VP: verapamil SF: Serum fizyolojik
CCl₄: Karbon tetraklorür i.p: intraperitoneal

da SGOT: 124+-15, SGPT: 60+-6, D grubunda ise SGOT: 978+-60, SGPT: 1028+-204 olarak bulundu. a (kontrol) ve C (VP verilen) gruplarda serum enzimleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. B grubu (CCl₄) ile kontrol grubu ($p<0,001$) ve D grubu (VP+CCl₄) ile kontrol grubu ($p<0,001$) arasında anlamlı farklılık saptandı. B ve D grupları serum enzimleri karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 1).

Histopatolojik değerlendirmede; A ve C grubu ratlarda normal karaciğer doku örnekleri izlendi. (Resim 2,3) Skorlar arası fark anlamlı değildi. B ve D grubu ratların karaciğer doku örneklerinin incelenmesinde sentrizonal alanda yaygın nekroz; iltihabi hücre infiltrasyonu, granüler, vakuoler dejenerasyon, bulanık şişme, "ballooning" dejenerasyon tanımlandı (Resim 4,5). A grubu ile B ($p=0,001$, $x^2=16,00$)



Şekil 1: Gruplara göre serum transaminaz değerleri.

Tablo II: Histopatolojik skorlama

Lezyon	Skor
Normal	1
Hafif granüler ve vakuoler dejenerasyon, bulanık şişme, konjesyon, mikroveziküler yağlanma	2
2+ hepatositlerde pignotik değişiklikler	3
"ballooning" dejenerasyon	4
2+3+sentrizonal bölgede şiddetli nekroz	4

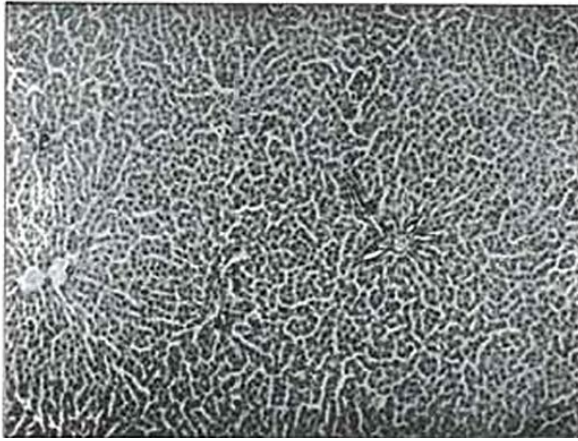
ve D ($p=0,004$, $x^2=13,00$) grupları skorlamaları arası fark anlamlı bulundu. B ve D grup skorlamaları arası fark ise anlamsızdı.

TARTIŞMA

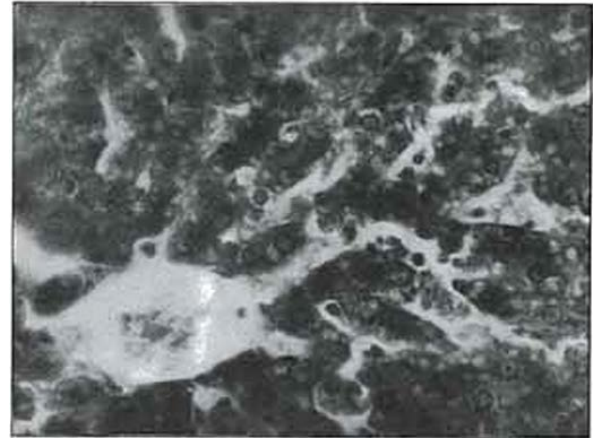
Deneyssel çalışmalarda CCl₄'ün, karaciğer hücresi endoplazmik retikulum tarafından yapılan Ca^{2+} sekestrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (1,17-19). Bu nedenle hücrelerde sitozolik Ca^{2+} düzeyleri artmaktadır. Ratlarda CCl₄ ile oluşturulan hepatotoksiste sonucu sitozolik Ca^{2+} 'un normalden 100 misli arttığı saptanmıştır. (6) İntrasellüler Ca^{2+} artışı sonucu Ca^{2+} bağımlı sitozolik enzimler aktive olmakta, irreversible hücre harabiyeti başlamaktadır.

Karaciğer parenkim harabiyetini gösteren önemli parametrelerden olan serum transaminazları deneyssel olarak CCl₄ verilisini takiben 6. saatte yükselmeye başlamakta, 12 saatte maksimum düzeylere çıkmaktadır (14,16,20). 72 saat sonra bile transaminaz düzeyleri yüksek seyretmektedir. Bu biyokimyasal markerların yanında morfolojik olarak da değişiklikler gözlenmektedir. CCl₄ verilisinden 24 saat sonra karaciğerin histopatolojik incelemesinde sentrizonal nekroz (20), yağlı dejenerasyon, pignotik nükleus, inflamatuvar hücre infiltrasyonu (21) gözlenmiştir.

Çalışmamızda da bu gözlemlerle uyumlu olarak ratlara CCl₄ verilisinden 24 saat sonra karaciğerlerinde biyokimyasal ve histopatolojik benzer değişiklikler bulunmuştur. Ayrıca



Şekil 2: Normal karaciğer dokusu SKOR-1 (H+Ex100)



Şekil 3: Mikroveziküler yağlanma, vakuoler dejenerasyon SKOR-2 (H+Ex400)

muhtemelen CCl₄'ün i.p verilmesine bağlı karaciğerde subkapsüler nekroz odakları saptanmıştır.

Ca²⁺ kanal blokerlerinin hücre koruyucu özellikler deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Ratlarda d-galaktozamin ve CCl₄ ile oluşturulan akut karaciğer harabiyetinde yükselen karaciğer enzimlerinin ilk 4 saat içinde verilen Ca²⁺ kanal blokerleri ile anlamlı şekilde düştüğü saptanmıştır (9). Ca²⁺ kanal blokerlerinin ayrıca Na⁺/K⁺-ATPaz, cAMP fosfodiesteraz, protein kinaz C ve kalmodülin gibi hücre içi sistemleri de etkilediği bilinmektedir (2,22).

Ca²⁺ kanal blokerlerinin antioksidan özellikleri vardır. VP'in lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasını ve endojen antioksidan olan glutatyonun kaybını önlediği gösterilmiştir (23). Ratlarda ise hepatosellüler iskemik-reperfüzyon harabiyetini muhtemelen oksijen

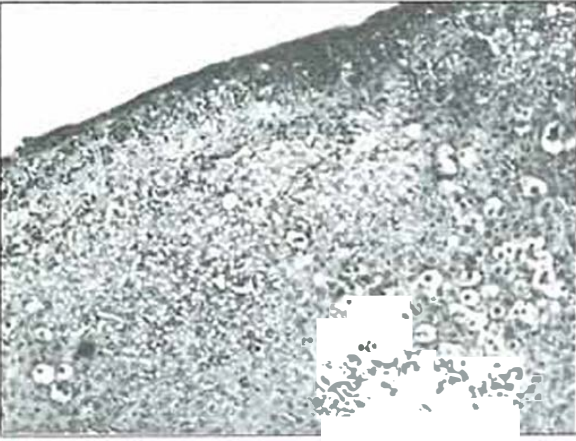
radikallerine karşı hücreyi koruyarak azalttığı saptanmıştır (8).

Ca²⁺ kanal blokerlerinin diğer bir özelliği de reseptör antagonisti olmalarıdır (24). VP'in rat karaciğerinde a-adrenerjik antagonizma gösterdiği saptanmıştır (25). Ayrıca histamin ve serotonin gibi inflamasyonda rol oynayan mediatörler ile oluşan kapiller permeabilite artışını (26-28) ve histamin (26) ile lökotrien (LTD₄) (29) tarafından oluşturulan düz kas kontraksiyonunu da önledikleri gösterilmiştir. Ca²⁺ kanal blokerlerinin vasküler düz kaslar üzerine vazodilatör etkileri vardır (5), karaciğerde hepatik arteriolervazodilatasyona yol açarak kan akımını artırır. Belirtilen tüm etkiler Ca²⁺ kanal blokerlerinin hücre koruyucu özelliklerini açıklamaktadır.

Ratlara thioasetamid, parasetamol ve CCl₄ uygulandıktan önce verilen nifedipinin (25mgr/kg) karaciğerde sentrilobüler nekroz oluşmasını önlediği rapor edilmiştir (5). VP'in ise 25mgr/kg dozlarında dimetilnitrosamin ile oluşturulan hepatik harabiyet tümüyle önlediği, CCl₄'e karşı ise kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (1). Diğer bir Ca²⁺ kanal blokeri olan diltiazem, endotoksemi sonucu oluşan karaciğer hücre içi Ca²⁺ birikimini dolayısıyla hücre harabiyetini önleyebilmektedir (30).

Tablo III: Ratlarda SGOT ve SGPT ortalama değerleri, standart sapmaları.

	SGOT (iu/ml)	SGPT (iu/ml)
(A) KONTROL	129±25	64±6
(B) CCl ₄	1903±239	1900±197
(C) VERAPAMIL	124±15	60±6
(D) CCl ₄ +VERAPAMIL	978±60	1028±204



Şekil 4: Karaciğerde subkapsüler nekroz, hepatositlerde pignotik değişiklikler, mikroveziküler yağlanma, vakuoller dejenerasyon "ballooning" dejenerasyon SKOR-3 (H+Ex200)



Şekil 5: Karaciğerde sentrizonal nekroz SKOR-4 (H+Ex100)

Ca^{2+} kanal blokerleri hücrede mitokondriyal Ca^{2+} alınımından çok mitokondriyal Ca^{2+} salınımını inhibe ederler (25). Deneysel çalışmalar hepatotoksinler ile oluşturulan harabiyette, voltaja bağımlı Ca^{2+} kanallarının, reseptöre bağımlı olanlara göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir (31). Ca^{2+} kanal blokerleri de çoğunlukla voltaja bağımlı kanalları etkileyerek hücreye Ca^{2+} girişini azaltarak, zedelenmeden en fazla etkilenen sentrilobüler bölgenin kanlanması ve oksijenasyonunu artırarak koruyucu etkilerini gösterirler (5).

Çalışmamızda da CCl_4 ile oluşturulan karaciğer harabiyetinin CCl_4 uygulanişından önce ve sonra verilen VP ile kısmen önlenebildiği gösterilmiştir. Muhtemeldir ki CCl_4 e karşı VP'in koruyuculuğu daha çok ultrastrüktürel düzeydedir. Bu nedenle ışık mikroskopisi ile yapılan patolojik analizlerde VP'in koruyuculuğu anlamlı olarak saptanamamıştır.

Sonuçlarımız hepatotoksik ajanlarca oluşturulan karaciğer hücre harabiyetinin gelişmesin-



Şekil 6: Karaciğerde sentrizonal nekroz SKOR-4 (H+Ex200)

de Ca^{2+} 'un önemli bir rol oynadığını, bu harabiyetin ise Ca^{2+} kanal blokerleri ile sınırlanabileceğini göstermektedir. Ca^{2+} kanal blokerlerinin hücre koruyucu etkilerinin mekanizmalarının açığa çıkarılabilmesi için geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Deakin CD, Fagan EA, Williams R: Cytoprotective effects of calcium channel blockers. *J Hepatol* 1991; 12:251-255.
2. Rasmussen H: The calcium messenger system. *N Engl J Med* 1986; 314:1094-1101.
3. Mauger JP, Claret M: Calcium channels in hepatocytes. *J Hepatol* 1988; 7:278-282.
4. Thomas CE, Reed DJ: Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989; 10:375-384.
5. Landon EJ, Naukam RJ, Sastry BVR: Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:697-705.
6. Long RM, Moore L: Elevated cytosolic calcium in rat hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986; 238(1) 186-191.
7. Malis C, Ilonvete JV: Mechanisms of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. *J Biol Chem* 1986; 261:14201-14208.
8. Stein HJ, Oosthuizen MM, Hinder RA: Effect of verapamil on hepatic ischaemic-reperfusion injury in normal and glutathione depleted rats. *Gastroenterology* 1989; 96: A663 (Abstr).
9. Garay GL, Annesley P, Burnette M: Prevention of experimental liver injury in rats by nicardipine, a calcium entry blocker. *Gastroenterology* 1984; 86: 1319 (Abstr).
10. Harish G, Meyer W: Studies on tissue distribution of glutathione and on activities of glutathione-related enzymes after carbon tetrachloride-induced liver injury. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1985 47(3) 399-414.
- Wang D, Vernoy E, Sidransky H: Protective effect of typtophan and cystein against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Exp Mol Pathol*. 1985 43(3) 364-374.
12. Nakata M, Katoh M, Sugimoto T: Protective effect of malotilate on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice and rats. *J Toxicol Sci*. 1985 10(4) 279-288.
13. Baumann M, Berauer M: Comparative study on the sensitivity of several serum enzymes in detecting hepatic damage in rats. *Arch Toxicol Suppl*. 1985 6P 370-372
14. Itoh S, Yamaba Y, Matsuo S, Oda T, Satoh T: Early changes in the lacticase activity in rats following treatment with CCl₄. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1985 49(3) 447-450.
15. Charbonneau M, Iijima M, Cote MG, Plaa GL: Temporal analysis of rat liver injury following potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity with ketonic or ketojenic compounds. *Toxicology*. 1985 35 (2) 95-112.
16. Smejkalova J, Simek J, Rouchal J, Dvorackova I: The time course of biochemical and histological changes following carbon tetrachloride-induced liver damage in rats of both sexes. *Physiol Bohemoslov*. 1985 34(6) 494-501.
17. Irvine RF: Calcium transients: Mobilisation of intracellular Ca²⁺. *Br Med Bull* 1986; 42:369-374.
18. Agarwal AK, Mehendale HM: Effect of chlordecone on carbon tetra-chloride-induced increase in calcium uptake in isolated perfused rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 83(2) 342-348.
19. Long RM, Moore L: Cytosolic calcium after carbon tetrachloride, 1,1-dichloroethylene, and phenyleprine exposure. Studies in rat hepatocytes with phosphorilase a and quin2. *Biochem Pharmacol*. 1987; 36(8) 1215-1221.
20. Voronin Afu, Maiankii DN: Increased hepatocyte resistance to CCl₄ following the stimulation of rats with a bacterial poly-saccharide. *Farmacol Toksikol* 1985; 48(4) 96-99.
21. Tokeda S, Funo S, Iizuka A, Kase Y, Arai I, Ohkura Y et al: Pharmacological studies on schizandra fruits. Effects of wuweizisu C, a lignan component of schizandra fruits, on experimental liver injuries in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1985; 85(3) 193-208.
22. Blackmore PF, El-Refai MF, Exton JH: Alpha-adrenergic blockade and inhibition of A23187 mediated Ca²⁺ uptake by the calcium antagonist verapamil in rat liver cells. *Mol Pharmacol* 1978; 15:598-606.
23. Stein HJ, Fayman MS, Oosthuizen MM, Hinder RA: Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. *Surgery*. 1989; 106(4) 617-622.
24. Godfraind T, Miller R, Wilbo M: Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* 1986; 38:321-416.
25. Buss WC, Savage DD, Stepanek J, Little SA, McGuffee LJ: Effect of calcium channel antagonist on calcium channel uptake and release by isolated rat cardiac mitochondria. *Eur J Pharmacol* 1988; 152:247-253.
26. Mayhan WC, Joyner WJ: The effect of altering the external calcium concentration and a calcium channel blocker, verapamil, on microvascular leaky sites and dextran clearance in the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 1984; 28:159-179.
27. Defeudis FV: The Ca²⁺ channel and 5-HT₂ receptor antagonist(s) enopamil in cerebral ischaemia. *Trends Physiol Sci*. 1989; 10:215-217.
- Baethmann A, Jansen N: Possible role of calcium entry blockers in brain protection. *Eur Neurol* 1986; 25:102-114.
29. Weichmann BM, Muccitelli RM, Tucker SS, Wasserman MA: Effects of calcium antagonists on leukotriene D₄-induced contractions of the guinea pig trachea and lung parenchyma. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 225:310-315.
30. Sayeed NM, Maitra SR: Effect of diltiazem on altered cellular calcium regulation during endotoxic shock. *Am J Physiol* 1987 253:R549-R554.
31. Schwartz A, Triggle DJ: Cellular action of calcium channel blocking drugs. *Ann Rev Med* 1984; 35:325-339.