

## مطالعه هیستوپاتولوژیک و فراساختار اثرات آننول، پروپرانولل و دپلتیازم بر هیپاتوسیت‌های موش سفید کوچک آزمایشگاهی

رویا زمانی<sup>۱</sup>، مرتضی انوری<sup>۲\*</sup>، محمود اخوان تفتی<sup>۲</sup>، علیرضا وحیدی<sup>۴</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد

۲- گروه آناتومی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۳- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۴- گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: moanvari@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۲۶

### چکیده

**هدف:** در این مطالعه اثر سمیت زایی سه داروی ضد فشار خون (پروپرانولل، آننول و دپلتیازم) بر سلول‌های کبد با یکدیگر مقایسه شده است.

**مواد و روش‌ها:** داروها به مدت یک ماه همراه با غذا به موش‌های نر بالغ ۸ هفته‌ای از نژاد NMRI داده شد. موش‌های گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ روزانه به ترتیب ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آننول، ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروپرانولل و ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دپلتیازم دریافت کردند. ۱۲ تا ۱۵ ساعت قبل از کشتن حیوانات غذای موش‌ها قطع شد و پس از جراحی نمونه‌های بافت کبد مورد بررسی میکروسکوپی نوری و الکترونی قرار گرفتند. شاخص فعالیت هیپاتیت نیز محاسبه شد.

**نتایج:** در گروه کنترل بافت‌ها طبیعی و بدون علائم پاتولوژیک بودند. تغییرات اصلی بافتی در گروه‌های تجربی شامل انفیلتراسیون پورتال لنفوسیت‌ها و نکروز لقمه‌ای در هر سه گروه تجربی، و فیبروز وسیع در گروه پروپرانولل بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده افزایش میزان ریبوزومها و انکلوژیونها در سلول‌های کبدی در هر سه گروه تجربی بود. در موش‌های دریافت کننده پروپرانولل تخریب میتوکندری و گسستگی غشاء مشاهده شد. در موش‌های دریافت کننده دپلتیازم، شبکه آندوپلاسمی در هیپاتوسیت‌ها کاملاً تکه تکه شده و تمامی کریستاهای میتوکندری‌ها آسیب دیده بودند.

**نتیجه گیری:** هر سه دارو از نظر کمی در موش‌های نر باعث ایجاد مسمومیت کبد شدند. از لحاظ کیفی تصاویر میکروسکوپ الکترونی در دو گروه تیمار شده با پروپرانولل و دپلتیازم حکایت از سمیت شدید این دو داروست. از سه داروی مورد بررسی به نظر می‌رسد که دپلتیازم سمیت بیشتری برای کبد داشته باشند.

**واژگان کلیدی:** آننول، پروپرانولل، دپلتیازم، بافت کبدی، میکروسکوپ الکترونی

## مقدمه

سالانه به طور متوسط حدود یک دهم از کل تعداد داروهای فروخته شده در کشور ما متعلق به داروهای قلبی- عروقی است. از سوی دیگر فروش عددی این داروها در هر سال به طور متوسط از یک رشد آهسته ۹/۵ درصدی نسبت به سال قبل برخوردار می‌باشد و در مجموع بالاترین میزان فروش عددی به ترتیب به داروهای پروپرانولول ۱۰ میلی گرم و آننول ۱۰۰ میلی گرم اختصاص دارد. از طرف دیگر در میان داروهای قلبی- عروقی تولید داخل داروهای آننول و دیلتیازم بیشترین میزان فروش ریالی را به خود اختصاص داده اند (۱). بنابراین داروهای بتا بلاکر در درجه اول و مسدودکننده‌های کانال کلسیم در درجه دوم اهمیت می‌باشند. پرداختن به مبحث داروهای قلبی- عروقی ناشی از اهمیتی است که این داروها در حفظ سلامت افراد و نیز کاهش مرگ و میر بیماران قلبی- عروقی دارا می‌باشند. در کشورهای صنعتی و غیر صنعتی صرف نظر از سوانح و حوادث جاده ای، عمده ترین عامل مرگ و میر جمعیت‌ها بیماری‌های قلبی- عروقی شناخته می‌شود (۲). فشارخون بالا خطری برای ایجاد حمله قلبی و صدمه جدی به کلیه‌هاست. آننول و پروپرانولول داروهایی متعلق به گروه بتابلاکرها می‌باشند که در بیماری‌های قلبی - عروقی کاربرد فراوان دارند (۳). گروه دیگری از داروها برای معالجه فشارخون، آنتاگونیست‌های کلسیم مثل دیلتیازم است که بر قدرت انقباض قلب اثر منفی دارند و به این طریق فشار خون را پائین می‌آورند (۴).

کبد اندام اصلی است که قادر است داروها را به اشکالی تبدیل کند که به آسانی از بدن حذف شوند. در ده سال گذشته توجه دانشمندان به تاثیر داروهای ذکر شده بر مرگ و تکثیر سلولی منعطف شده است (۵). بخصوص اطلاعات ضد و نقیضی در مورد تاثیر بلوکهای کانال کلسیم به چشم می‌خورد (۷). این داروها حتی برای زنان دارای فشار خون بالا تجویز می‌شود و ممکن است آثار جبران ناپذیری بر کبد مادر و جنین داشته باشند (۸). با توجه به اهمیت کبد در بدن، بیماران کبدی و افراد مسن بایستی از لیست داروهای هیپاتوتوکسیک آگاهی داشته باشند و از آنجا که افراد مسن به آسیب کبدی ناشی از دارو حساس ترند و ضمناً این گروه سنی از داروهای ضد فشار خون بیشتری استفاده می‌کنند ضرورت این آگاهی در جامعه پزشکی بیشتر می‌شود. در مطالعه حاضر دوزهای فارماکولوژیک به کار رفته در انسان برای حیوانات در نظر گرفته شد و تاثیر سه داروی ذکر شده، از نظر شدت تاثیرات ناخواسته بر تغییرات فراساختمانی بافت کبد مانند تغییرات غشای پلاسمایی، غشای هسته، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری و واکوئل‌های اتوفازیک در هیپاتوسیت‌ها با هم مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

۲۴ راس موش نر بالغ نژاد NMRI با وزن بین ۳۵-۳۱ گرم به طور تصادفی به چهار گروه شامل سه گروه تجربی (۱، ۲ و ۳) و یک گروه کنترل تقسیم شدند. حیوانات در قفس های شفاف از جنس پلکسی گلاس در گروه های ۶ تایی نگه داری شدند. در طی دوره تحقیق تحت شرایط یکسان و استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، تهویه مناسب و دما (۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و آب و غذا به اندازه کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. داروهای مورد نظر به صورت پودر شده با غذای استاندارد مخلوط و به صورت قطعات لوله‌ای شکل در اختیار موش‌های گروه های تجربی قرار داده شد به نحوی که گروه تجربی ۱ روزانه ۵۰ میلی بر کیلوگرم آننول (شرکت حکیم)، گروه تجربی ۲ روزانه ۸۰ میلی بر کیلوگرم پروپرانولول (شرکت حکیم) و گروه تجربی ۳ روزانه ۱۸۰ میلی بر کیلوگرم دیلتیازم (شرکت سبحان) را به مدت یک ماه دریافت کردند (۹و۱۰). گروه کنترل تنها غذای معمولی به صورت بدون محدودیت دریافت نمودند.

۱۲ تا ۱۵ ساعت قبل از کشتن حیوانات، غذای موش‌ها قطع شد و سپس با روش جا به جایی مهره گردنی حیوانات کشته شدند و از هر حیوان دو نمونه کبدی گرفته شد. یک نمونه در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید و از آن مقاطع ۵ میکرونی تهیه و بر روی آن‌ها رنگ آمیزی های هماتوکسیلین- ائوزین و تری کروم ماسون انجام شد و پس از مطالعه با میکروسکوپ نوری، شاخص های درجه بندی التهاب، محاسبه و نتایج حاصله مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. معمول ترین روش جهت ارزیابی التهاب کبدی روش HAI (Histology Activity Index) یا نودل (Knodel) می‌باشد. پس از نمره گذاری نتایج با جدول استاندارد زیر مقایسه گردید (۱۱).

0 = no inflammation

1-4 = minimal inflammation

5-8 = mild inflammation

9-12 = moderate inflammation

13-18 = marked inflammation

نمونه دیگر جهت تهیه مقاطع میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که از بافت های کبدی تکه‌هایی با اندازه حدود ۱ میلی متر مربع تهیه و در فرم آلدهید ۳ درصد قرار داده شد و سپس به بخش میکروسکوپ الکترونی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز ارسال گردید.

در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

درجه بندی التهاب در گروه آننول و پروپرانول نسبت به گروه تیمار شده با دیلتیازم تغییرات معنی داری را نشان داد ( $P \leq 0.01$ )

جدول ۱: میانگین و خطای معیار مربوط به درجه بندی اندکس هیپاتیت در گروه کنترل و گروه های تجربی.

Grading	گروه ۶ n=
۱/۴±۰/۲۴	کنترل
۳/۶±۰/۴ a	آننول
۴±۰/۷۷ a	پروپرانول
۵/۴±۰/۶۸ b	دیلتیازم

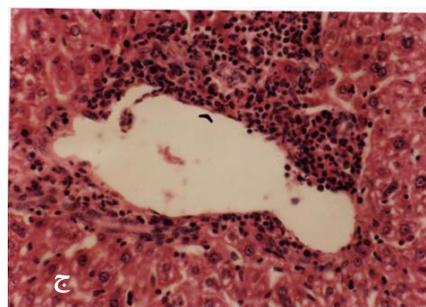
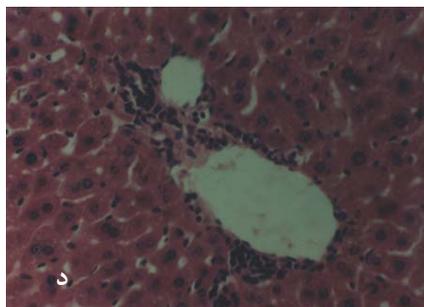
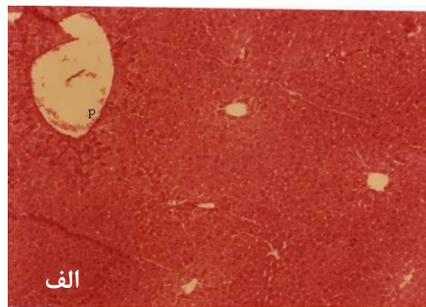
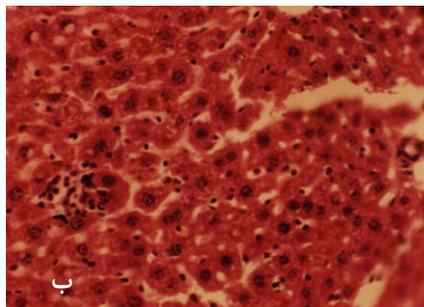
a  $P \leq 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل  
b  $P \leq 0.01$  در مقایسه با آننول و پروپرانول

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده با میکروسکوپ نوری با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار ارائه شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

### نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تفاوت درجه بندی التهاب بین گروه‌های تجربی و کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای بالاست. به طوری که در هر سه گروهی که دارو دریافت کرده بودند افزایش قابل ملاحظه‌ای در درجه بندی التهاب نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱). تیمار آننول نسبت به گروه پروپرانول تغییرات معنی داری را نشان نداد. در حالی که



شکل ۱: مقاطع کبدی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین الف: گروه کنترل، سیاهرگ پورت در سمت چپ در بالا مشخص است (بزرگنمایی:  $100\times$ ). ب: گروه آننول؛ تجمع لنفوسیت‌ها و حالت التهابی به طور متوسط مشهود است. (بزرگنمایی:  $400\times$ ). ج: گروه پروپرانول؛ در این تصویر التهاب شدید در ناحیه پورت همراه با نکروز لقمه‌ای واضح در چندین نقطه از حاشیه پورت نمایان است. د: گروه دیلتیازم؛ التهاب در ناحیه پورت همراه با نکروز لقمه‌ای مشاهده می‌شود (بزرگنمایی:  $400\times$ ).

فراوان و دسته‌های منظم شبکه آندوپلاسمی خشن به نظر می‌رسیدند (شکل ۲- الف).

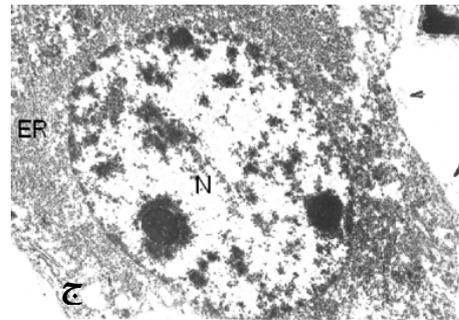
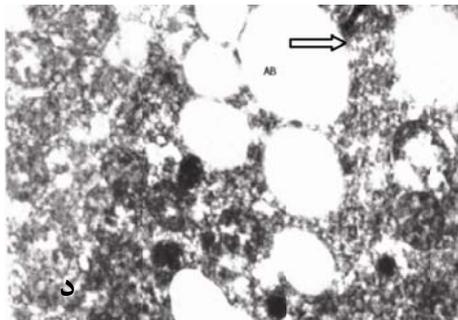
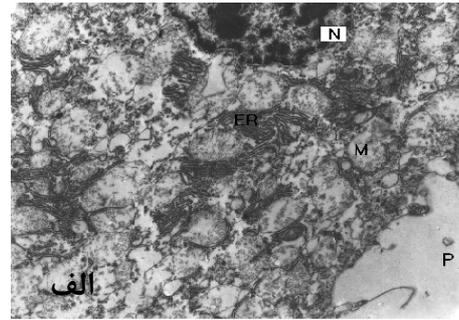
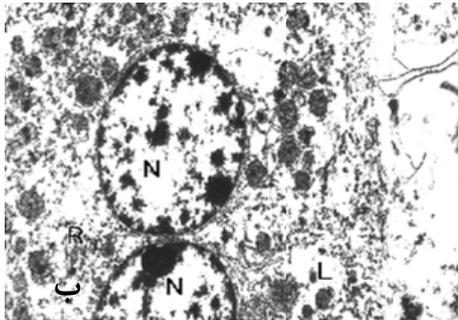
تصاویر میکروسکوپ الکترونی از تیمار آننول تغییراتی را به شرح زیر نشان داد: غشای سلول کمی گسسته شده و تعداد ریبوزوم‌ها افزایش نشان داد. همچنین تعداد لیزوزوم‌ها افزایش چشمگیری داشت. غشای هسته سالم بود ولی فضای روشن داخل هسته بیشتر از کنترل مشاهده گردید (شکل ۲- ب).

### نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی از مقاطع کبدی گروه کنترل با درشت‌نمایی‌های مختلف هیچ مورد غیرطبیعی را نشان نداد. غشای سلول، غشاء هسته، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و ریبوزوم‌ها با کیفیت و کمیت طبیعی مشاهده شدند. هیپاتوسیت‌ها در نمای میکروسکوپ الکترونی سلول‌هایی با میتوکندری‌های

تصویر میکروسکوپ الکترونی از تیمار دیلتیازم سمیت بسیار شدید دیلتیازم را نشان داد: شبکه آندوپلاسمی کاملاً تکه تکه شده و تمامی کریستاهای میتوکندری‌ها آسیب دیده بودند. افزایش انکلوژیون در سیتوسل مشهود بود و تراکم ریبوزوم‌های آزاد دیده می‌شد. در حالی که غشای سلولی در نمونه‌ها سالم و دست نخورده بود (شکل ۲-د).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی از تیمار پروپرانولل تغییرات بیشتری را نسبت به گروه قبل نشان داد: علاوه بر فعالیت بالای پروتئین سازی که در گروه آنتول هم مشاهده شده بود، تخریب میتوکندری، گسستگی غشا با وسعت بیشتر به همراه تعدادی لیزوزوم در سیتوسل مشاهده شد. همچنین وجود لنفوسیت‌ها تغییرات التهابی را علاوه بر نکروز سلول‌های کبدی نشان داد (شکل ۲-ج).



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از کبد موش های کنترل و تجربی. الف: گروه کنترل؛ تمامی ارگانل‌ها به شکل کاملاً طبیعی و منظم در سیتوسل پراکنده اند. درشت نمایی:  $5200\times$ . N: هسته هیاتوسیت، ER: شبکه آندوپلاسمی، M: میتوکندری، P: فضای پورت. ب) کبد گروه دریافت کننده آنتول، دو هسته (N) در هیاتوسیت دیده می‌شود. شبکه آندوپلاسمی خشن سالم به نظر می‌رسد اما افزایش ریبوزوم آزاد (R) و افزایش لیزوزوم (L) یک تیرگی خاصی به سیتوسل داده است. غشای هسته نیز طبیعی است. بزرگ نمایی:  $5200\times$ . ج) کبد تیمار پروپرانولل با بزرگ نمایی  $6600\times$ . هسته هیاتوسیت با غشایی سالم به چشم می‌خورد، لیکن غشای سلول در سمت راست عکس گسسته است. میتوکندری‌های تخریب شده و افزایش گلیکوژن و اجسام اتوفازیک مشهود است. N: هسته، ER: شبکه آندوپلاسمی. د) مقطع کبد گروه دریافت کننده دیلتیازم. شبکه آندوپلاسمی کاملاً تخریب شده و تراکم ریبوزوم آزاد بالا است. اجسام اتوفازیک حاوی چربی یا لیپوفوشین دیده می‌شود. بزرگ نمایی:  $11500\times$ .

## بحث

مزم (یک ماه) استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که هر سه دارو با شدت و ضعف‌های مختلفی بر روی کبد موش موثر بودند.

نتایج حاصل از بررسی با میکروسکوپ نوری و به دست آوردن شاخص فعالیت هپاتیت نشان داد که هر سه دارو شاخص درجه بندی هپاتیت بالایی نسبت به گروه کنترل داشته‌اند. گروه دیلتیازم نسبت به دو گروه تجربی دیگر نیز افزایش التهاب قابل ملاحظه در حد  $P < 0.05$  را نشان داد.

در تفسیر نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش ریبوزوم و فضای روشن داخل هسته موید افزایش پروتئین سازی در هیاتوسیت‌های در گروه‌های

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر سه داروی مختلف ضد فشار خون بر تغییرات فراساختار سلول‌های کبدی بود. برای تجویز دارو به صورت مزم روش‌های گوناگونی وجود دارد (۹ و ۱۰). در پژوهش حاضر، داروها به همراه غذا به مدت یک ماه به حیوانات خوراندند تا از هر گونه استرس ناشی از جابجایی و تزریق داخل صفاقی روزانه و یا قراردادن کپسول زیر جلدی توسط جراحی جلوگیری گردد.

در این تحقیق از سه داروی مختلف، آنتول (انتخابی) و پروپرانولل (غیر انتخابی) به عنوان عوامل بلوکه کننده بتا-آدرنژیک و دیلتیازم که بلاکر کانال کلسیم می‌باشد به صورت

می‌روند. از طرفی برای اثبات آپوپتوزیس نیاز به انجام تکنیک‌های دیگری چون آنالیز DNA توسط ژل الکتروفورز می‌باشد (۱۸).

پروپرانولل یک بتا آنتاگونیست غیر انتخابی است و از آنجا که گیرنده‌های بتا- دو آدرنژیک در کبد در جلوگیری از مرگ سلولی موثر شناخته شده‌اند (۶)، به نظر می‌رسد که پروپرانولل به عنوان مسدود کننده این گیرنده‌ها، سلول‌های کبدی را از این طریق به عوامل آپوپتوزیس حساس می‌سازد.

گروه دپلتیازم نسبت به دو گروه تجربی دیگر نیز افزایش التهاب قابل ملاحظه در حد معنی‌دار را نشان داد. دپلتیازم دارویی لیپوفیل است که ورودش به داخل سلول آسان‌تر می‌باشد (۱۹) و احتمالاً تغییرات شدیدتر در گروه دپلتیازم به همین علل می‌باشد.

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که دپلتیازم بیشترین آسیب را به کبد وارد نموده است. گزارش‌های متفاوتی در ارتباط با اثر ترکیبات بلوکه کننده کانال کلسیم (L-type) بر پیشبرد مرگ سلولی تاکنون مطرح بوده است. ایتو و همکارانش (۲۰) نشان دادند که دپلتیازم می‌تواند به عنوان آنتاگونیست کلسیم، سمیت زایی CCL4 را در کبد کاهش دهد. در حالی که نتایج ما کاملاً در راستای تحقیقات عبدالسلام و همکارانش (۲۱) می‌باشد که بر اساس آن، دپلتیازم نه تنها سمیت زایی CCL4 را در کبد کاهش نمی‌دهد بلکه به دلیل اثرات عمیق همودینامیک و تغییرات متابولیسمی و افزایش آنزیم‌های آلانین آمینوترانس فراز و آسپاراتات آمینوترانس فراز در سرم، باعث نکرز شدید و تغییرات فراساختاری در سلول‌های کبدی شده بود. به هر ترتیب هم کاهش و هم افزایش یون کلسیم در سیتوسل می‌تواند سبب سمیت زایی در کبد گردند (۲۲). نیشی یاما و همکارانش (۲۳) نشان دادند که دپلتیازم یک اثر مهار مستقیم بر بتا اکسیداسیون اسید چرب دارد و از این طریق موجب مهار جذب اکسیژن کبدی می‌گردد. همچنین برنکا و همکارانش (۲۴) نشان دادند که دپلتیازم موجب کاهش پتانسیل الکتریکی غشاء علاوه بر کاهش مصرف اکسیژن در سلول‌های کبدی موش صحرائی می‌گردد. میکروگراف‌های به دست آمده در تحقیق ما نیز تخریب میتوکندری‌ها و افزایش لیزوزوم‌های حاوی لیپوفوشین را نشان می‌داد که همگی خبر از تغییر سوخت و ساز یا متابولیسم بیوانرژی را می‌دهند. برخی گزارش‌ها نشان داده است که ترکیبات مسدود کننده کانال کلسیم در محیط کشت، مرگ سلولی را تسریع می‌کنند و منتج به کاهش گسترش تومور می‌شوند (۲۵). در بررسی بافتی که ما از تیمار دپلتیازم به دست آوردیم نکرز لقمه ای خفیف در اطراف پورت همراه با تجمع لنفوسیت های T مشاهده شد که خود حکایت از مرگ سلولی دارد.

تجربی بود (۱۲). البته پروتئین سازی جهت روند سمیت زدایی در کبد طبیعی است، اما گسستگی غشاء در دو گروهی که داروهای آننول و پروپرانولل دریافت کرده بودند حاکی از پیشرفت روند نکرز در سلول‌ها می‌باشد. در گروهی که دپلتیازم دریافت نموده بودند، سالم بودن غشاء همراه با افزایش لیزوزوم و واکوئل‌ها و همچنین نابودی کامل شبکه آندوپلاسمی و کریستاهای میتوکندری‌ها حکایت از اتوفاژی یا پدیده‌ی اتولیز بود که البته همه اینها بیانگر انواعی از مرگ سلولی می‌باشند (۱۳).

داروهای مختلف به طرق گوناگون به کبد آسیب می‌رسانند. برخی داروها به طور ذاتی برای کبد سمی محسوب می‌شوند و به صورت وابسته به دوز باعث سمیت کبدی می‌گردند و در دوزهای بالاتر صدمات بیشتری ایجاد می‌نمایند. این دسته داروها معمولاً توسط سیستم آنزیمی سیتوکرومی شکسته می‌شوند. در شرایط طبیعی، سیستم آنزیمی مواد سمی را به مواد غیر سمی تبدیل می‌کند لیکن در موقعیتی که دارو سمیت زا است به طور معکوس یک داروی غیر سمی به محصولات فرعی سمی شکسته می‌شود و تجمع این محصولات فرعی سبب صدمه به کبد می‌گردد (۱۴). یک مثال از این دسته داروها مسکن استامینوفن است. از طرفی برخی داروها قادرند واکنش خود به خود و غیر قابل انتظار ایجاد کنند. چنین واکنش آلرژیکی ربطی به میزان داروی به کار گرفته شده ندارد و بنا بر این میزان صدمه نیز غیر قابل پیش بینی است و در مواقعی که دارو برای چند هفته به کار رفته است واکنش‌ها شروع می‌شود. مثال دارویی آن فنی توتین است (۱۵). برخی عوامل دیگر مثل سن و جنس هم در آسیب کبدی به عنوان فاکتورهای موثر ذکر می‌شوند (۱۶).

آزار سلولی در کبد گاه به شکل آپوپتوزیس مشاهده می‌شود. آپوپتوزیس فرآیندی انرژی خواه و وابسته به سنتز پروتئین‌های ویژه سلولی است که شامل مراحل رونوشت برداری از DNA و تولید پروتئین‌های خاصی است که مسیر تخریب را دیکته می‌کنند. آپوپتوزیس می‌تواند در جذب و ترشح و انتقال مواد از طریق غشاء تغییراتی ایجاد کند و مناظر مورفولوژیک اولیه آن شامل تغییرات غشایی بوده است و در مراحل بعدی هسته فشرده و قطعه قطعه می‌شود و در نهایت سلول به اجسام آپوپتوتیک تقسیم می‌شود (۱۷). الگوی نکرز مشاهده شده در آزمایش‌های ما شامل تخریب دیواره سلولی، تغییرات شبکه آندوپلاسمی شامل جدا شدن ریبوزوم‌ها، تورم میتوکندری‌ها و ظهور اجسام اتوفاژیک بود. از طرفی افزایش تعداد ریبوزوم‌ها و فضای روشن داخل هسته (یو کروماتین) نمایانگر افزایش سنتز پروتئین می‌باشد. بر اساس اطلاعات جاری هنوز مرز بندی کاملاً مشخص بین آنچه که به آن نکرز یا آپوپتوزیس نام نهاده‌اند وجود ندارد و هر دو فرآیند اجزای یک طیف پیوسته از مرگ سلولی به شمار

repeated oral administration of propranolol. *Drug Metabol. Pharmacokin.* 2002; 17(1): 54-59.

11. Knodell RG. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic acyive hepatitis. *Hepatology*. 1981; 1(5) 431-5.

12. Andrews DW, Walter P, Ottensmeyer FP. Structure of the signal recognition particle 5-789. by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82,78

13. Valdivia E, Berger JE. Atypical electron microscope structures in liver mitochondria. *Pathol Microbiol.* 1973; 39(2)112-4.

14. Pal R, Rana S, Vaiphei K, Songh K. Effect of different doses of carotenoids in isoniazid-rifampicin induced hepatotoxicity in rats. *Trop Gastroenterol.* 2008; 29(3):153-9.

15. Rochon J, Protiva P, Seef LB, Fontana RJ, et al. Reliability of the Roussel Uclaf Causality Assessment Method for assessing causality in drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2008; 48(4):1175-83.

16. Kshirsagar A, Vetal Y, Ashok P, Bhosle P, et al. Drug Induced Hepatotoxicity: A Comprehensive Review. *The Internet Journal of Pharmacology.* 2009; 7: 1.

17. Hung Y.D, Chang P, Weiss M, Roberts MS. Structura- hepatic disposition relationships for cationic drugs. *J Pharmacol Experiment Therapeu.* 2002; 297(2): 780-89.

18. Jones A, Gores, G. Physiology and pathophysiology of apoptosis. *Am Phsiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997; 273: G1174-G1188.

19. Tinari A, Giammarioli AM, Manganeli V, Ciarlo L. Chapter one analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. *Methods Enzymol.* 2008; 442:1-26.

20. Itoh S, Gohara S, Matsuo S, Yamaba Y. Effects of calcium antagonist diltiazem on liver calcium content and necrosis of hepatocytes in rats. following treatment with CCL4. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1988; 60(1): 133-6.

21. Abdel Salam O, Hassan N, Baluomy A, Karam H. The effect of amlodipine, diltiazem and enalapril on hepatic injury caused in rats by the administration of CCL4. *J Pharmacol & Toxicol.* 2007; 2: 610-620.

22. Dimova S, Koleva M, Rangelova D, Stoythchev T. Effect of nifedipine, verapamil, diltiazem and trifloperazine on acetaminophen toxicity in mice. *Arch Toxicol.* 1995; 70(2): 112-8.

23. Nishiyama P, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A. Diltiazem inhibits fatty acid oxidation in the isolated perfused rat liver. *Cell Biochem Funct.* 1997; 15(4): 223-8.

## نتیجه گیری

هر سه داروی ضد فشار خون (آتنولل، پروپرانولل و دیلتیازم) تغییرات ساختاری و فراساختاری سلولی قابل ملاحظه ای بر روی کبد موش سوری ایجاد کردند که از جمله این تغییرات می توان به پارگی غشای سلولی و نکروز لقمه ای در سلول های کبدی اشاره کرد. اما شدت سمیت زایی دیلتیازم بیشتر از دو داروی دیگر بود. همچنین به نظر می رسد مصرف داروی آتنولل که انتخابی عمل می کند به صورت مزمن برای سلول های کبد موش سمیت کمتری داشته باشد.

## تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاری مسئول و کارشناس بخش میکروسکوپ الکترونی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز که در تهیه مقاطع بافتی جهت مطالعه فراساختاری نمونه ها ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می آید.

## منابع

- Gholami K, Soleimani F, Zamanzadeh m, Mohammadi AR. Prescription of cardioiovascular drugs in Iran. *Razi Journal.* 2003; 9: 40-51.
- Minno M, Heron MP, Murphy SL. Death:Final data for 2004. *National Vital Statistics Reports.* 2007; 55(19):7.
- Mccormac J. Drug therapy decision making guide. First Ed.: WB Saunders; 1996; 13-22.
- Preston R. Calcium channel blockers. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34:1857-1866.
- Bush R, Kononen L, Machida S, Sieving P. The effect of calcium channel blocker diltiazem on photoreceptor degeneration in the rhodopsin pro23his rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:2697-2701.
- Andre C, Couton D, Gaston J, Erraji L, et al. Beta2 adrenergic receptor slective agonist clenbuterol prevents Fas- induced liver apoptosis. *Am J Phsiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999; 276: G647-G654.
- Farias FE, Aguirre G, Ladedo V, Joffe EB. Verapamil inhibits tumor protease production in murine carcinoma cells. *Internatio J of Canc.* 1998; 78(6): 727-734.
- Easterling TR, Carr DB, Brateng D, Diederichs C, et al. Treatment of hypertension in pregnancy. *Obstetrics & Gynecol.* 2001, 98(4): 427-433.
- Chu V, Otero J. Oral propranolol reduce Cardiac sympathetic activity in mice. *Muscle & Nerve physiol.* 2001; 1:6.
- Narimatsu S, Mochida M, Ueno K, Horie T, et al. Induction of cytochrome p450 1A1 in mice by

24. Branco D, Vincenti E, Roberti S, Gambaretto G, et al. Effect of diltiazem on liver mitochondria of rats. *Comparative Pharmacol.* 1993; 104(1):47-49.
25. Preston R, Calcium channel blockers. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34: 1857-1866.

## A Comparative Study on the Effects of Atenolol, Propranolol and Diltiazem in Mice Hepatocytes

Zamani R<sup>1</sup>, Anvari M<sup>2\*</sup>, Akhavan Tafti M<sup>3</sup>, Vahidi AR<sup>4</sup>

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Yazd University, Yazd, Iran

2- Anatomy Department, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of medical Sciences, Yazd, Iran

3- Department of pathology Shahid Sadoughi University of medical Sciences, Yazd, Iran

4- Department of Pharmacology, Herbal Medicine Research Center, Shahid Sadoughi University of medical Sciences, Yazd, Iran

\* Email corresponding author: moanvari@yahoo.com

Received: 17 Mar. 2011

Accepted: 9 Jan. 2012

---

### Abstract

**Aim:** In this study the toxic effect of the three anti hypertensive drugs (atenolol, propranolol and diltiazem) on hepatocytes were investigated.

**Materials and Methods:** The 8 weeks old adult male NMRI mice were fed with or without the drugs for 1 month. Mice were divided into 4 groups that received atenolol (50 mg/kg/daily), propranolol (80 mg/kg/daily), and diltiazem (180 mg/kg/daily). Food access was stopped 12 to 15 h before the mice were sacrificed and processed for light and transmission electron microscopic evaluation. In addition modified Hepatitis Activity Index was computed too.

**Results:** In the control group no pathological sign was observed. Main histological changes such as portal infiltration of lymphocytes and piecemeal necrosis in all three experimental groups as well as expanded necrosis in propranolol group were seen. In addition electron microscopic imaging indicated an increase in the level of free ribosomes and glycogen droplets in the experimental groups. Also in the mice treated with propranolol group mitochondria membrane disruption were seen, whereas in the group treated with diltiazem, the mitochondrial cristae and endoplasmic reticulum Disintegration could be observed.

**Conclusion:** Chronic oral administration of atenolol, propranolol and diltiazem in male mice caused hepatotoxicity. The most pathological effects were observed in the group treated with diltiazem, though electron microscopic imaging indicated the propranolol and diltiazem were more toxic than the other one.

**Key words:** Atenolol, Propranolol, Diltiazem, Liver tissue, Electron microscopy