

Katedra i Zakład Patomorfologii. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Daniel Chibowski

Janina TRYKSZA, Barbara PAWŁOWSKA-WAKOWICZ,  
Zofia SIEZIENIEWSKA, Daniel CHIBOWSKI

**Wpływ fenobarbitalu na obraz morfologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny  
wątroby szczura uszkodzonej czterochlorkiem węgla. II. Badania ultrastrukturalne**

Влияние Фенобарбитала на морфологическую, гистохимическую и ультраструктуральную  
картину печени крысы поврежденной четыреххлористым углеродом.

II. Ультраструктуральные исследования

Effect of Phenobarbital on Morphological, Histochemical and Ultrastructural  
Image of Rat's Liver Damaged by Carbon Tetrachloride. II. Ultrastructural Studies

W badaniach histologicznych i histochemicznych wykazaliśmy, że indukcja fenobarbitalem enzymów mikrosomalnych wątroby zwiększa efekty hepatotoksyczne  $\text{CCl}_4$  w porównaniu z grupą zwierząt, która otrzymywała sam czterochlorek węgla.

Celem pracy jest przebadanie zmian komórkowych na poziomie ultrastrukturalnym ze szczególnym zwróceniem uwagi na te struktury cytoplazmatyczne, w których, jak przypuszczamy, jest zapoczątkowana reakcja peroksydacji lipidów pod wpływem wolnego rodnika  $\cdot\text{CCl}_3$ .

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Podział zwierząt na 2 grupy kontrolne i 2 grupy doświadczalne, sposób podawania szczurom fenobarbitalu i  $\text{CCl}_4$  oraz czas działania wymienionych preparatów przedstawiono w części I. Do badań ultrastrukturalnych pobierano wątrobę od 2 szczurów z każdej grupy. Wycinki utrwalono w 4% aldehydzie glutarowym w 0,1 M buforze kakodylowym, dotrwalano w 1% czterotlenku osmu w buforze Michalisa i zatapiano w Eponie 812. Wstępnie z bloczków eponowych krojono preparaty półcieńskie grubości 1  $\mu\text{m}$ , barwiono je błękitem toluidyny i wybierano okolicę żyły centralnej, strefy pośredniej lub brzeżnej zrazika wątrobowego. Preparaty ultracienkie krojono na ultramikrotomie Tesla BS 490A i dobarwiano nasyconym roztworem octanu uranylu oraz płynem Reynoldsa. Preparaty ultracienkie oceniano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500.

## WYNIKI BADAŃ

Grupa I kontrolna — obrazy ultrastrukturalne hepatocytów strefy centralnej, pośredniej i brzeżnej zrazików wątrobowych odpowiadały opisom normy.

Grupa II kontrolna — po indukcji fenobarbitalem obserwowano zwiększoną ilość gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER), głównie w hepatocytach strefy centralnej zrazika. SER występowała pod postacią licznych pęcherzyków i zajmowała znaczną część cytoplazmy hepatocytu (ryc. 1).

Grupa I doświadczalna — po 5, 10 i 20 min. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę szczura obrazy morfologiczne hepatocytów nie odbiegały od normy.

Po 30 min. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę w nielicznych hepatocytach strefy centralnej zrazika stwierdzono degranulację ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (RER). Odłączone rybosomy od błon szorstkich lokalizowały się w hialoplazmie w ich bliskim sąsiedztwie. W mitochondriach obserwowano niewielkie przejaśnienie macierzy. Pozostałe struktury cytoplazmatyczne nie wykazywały znamienych różnic w porównaniu z grupą I kontrolną.

Po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę degranulacja RER dotyczyła prawie wszystkich hepatocytów strefy centralnej zrazika. Wymienionej zmianie towarzyszyło poszerzenie kanałów i fragmentacja błon szorstkich (ryc. 3). W sąsiedztwie tak zmienionych błon rybosomy występowały najczęściej pojedynczo. Różnokształtne mitochondria o integralnych błonach posiadały macierz o zróżnicowanej gęstości elektronowej. Ponadto w hepatocytach strefy centralnej zrazika stwierdzono nieznaczne zwiększenie ilości kropli tłuszczowych. Pozostałe struktury cytoplazmatyczne nie wykazywały różnic w porównaniu z grupą I kontrolną.

Po 2 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę, poza zmianami RER o różnym stopniu nasilenia, stwierdzono wyraźne zmiany w mitochondriach. Polegały one na zmianie gęstości elektronowej macierzy, zatarciu struktury grzebieni mitochondrialnych lub ich fragmentacji oraz na zaniku ziarnistości mitochondrialnych. Równoległe ze zmianami RER i mitochondriów obserwowano zmniejszenie ilości ziaren glikogenu oraz zwiększenie ilości kropli tłuszczowych w hepatocytach strefy centralnej zrazika. Po tym samym czasie działania  $\text{CCl}_4$  obserwowano degranulację błon szorstkich w pojedynczych hepatocytach strefy pośredniej zrazika.

Po 4 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę w strefie centralnej zrazika opisane wcześniej zmiany nasilały się. Niektóre hepatocyty wykazywały cechy martwicy skrzepowej, a inne — zwyrodnienia wodniczkowego. W innych mniej zmienionych hepatocytach w cytoplazmie w bliskim sąsiedztwie uszkodzonych mitochondriów stwierdzano liczne figury mielinowe, które wypełniały twory wakuolarnie, otoczone podwójną błoną (ryc. 4). Natomiast w strefie pośredniej zrazika, niektóre hepatocyty miały podobne zmiany do obserwowanych w grupie zwierząt po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę.

Po 6 godz. działania  $\text{CCl}_4$  hepatocyty strefy centralnej zrazika wykazywały mozaikę, wyżej opisanych zmian. Ponadto w tej grupie zwierząt ogniskowo stwierdzano w świetle zatok naczyńowych obumarłe hepatocyty bądź ich resztki. Nieliczne hepatocyty strefy pośredniej zrazika miały znacznie poszerzone kanały RER, na niektórych odcinkach prawie całkowicie pozbawione rybosomów. Natomiast hepatocyty strefy brzeżnej wykazywały niewielkie zmiany zwyrodnieniowe pod postacią degranulacji, miernego poszerzenia kanałów RER i zwiększone ilości kropli tłuszczowych. Jedynie hepatocyty przylegające do przestrzeni wrotnych nie wykazywały żadnych zmian morfologicznych w porównaniu z grupą I kontrolną.

Grupa II doświadczalna — u zwierząt indukowanych fenobarbitem po 5 i 10 min. działania  $\text{CCl}_4$  obraz ultrastrukturalny hepatocytów strefy centralnej zrazika nie różnił się od obrazów obserwowanych po samym fenobarbitalu.

Po 20 min. działania  $\text{CCl}_4$  na indukowaną fenobarbitem wątrobę pierwszą uchwytą zmianą była degranulacja RER o większym stopniu nasilenia niż po 30 min. działania samego  $\text{CCl}_4$ . Uwolnione z błon rybosomy tworzyły skupienia w hialoplazmie (ryc. 2).

Po 30 min. działania  $\text{CCl}_4$  degranulacja błon szorstkich dotyczyła prawie wszystkich hepatocytów strefy centralnej. W miejscu nasilonej degranulacji obserwowano liczne pęcherzyki SER oraz zmniejszoną ilość wolnych rybosomów. Czasami zmianom tym towarzyszyły pojedyncze wakuole autofagowe. Otaczała je jedna lub kilka błon gładkich. W ich wnętrzu stwierdzano fragmenty cytoplazmy. Mitochondria zawierały macierz o różnej gęstości elektronowej.

Po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę indukowaną fenobarbitem nasilonej degranulacji hepatocytów strefy centralnej zrazika towarzyszyło dużego stopnia poszerzenie i fragmentacja kanałów RER, której struktury były wyraźnie zatarte (ryc. 5). Stopień nasilenia zmian RER był większy niż u zwierząt po tym samym czasie działania  $\text{CCl}_4$ . Niektóre mitochondria wykazywały cechy obrzęku. Czasami stwierdzano w ich wnętrzu figury mielinowe. Niekiedy mitochondria przylegały do figur mielinowych, które miały łączność morfologiczną z SER i systemem Golgiego. W wielu hepatocytach omawianej strefy obserwowano większe i mniejsze krople tłuszczowe i liczne figury mielinowe. Natomiast w strefie pośredniej zrazika nieliczne hepatocyty wykazywały cechy degranulacji RER.

Po 2 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę indukowaną fenobarbitem oprócz wyżej opisanych zmian w siateczce śródplazmatycznej stwierdzono znaczne uszkodzenie mitochondriów strefy centralnej. Mitochondria obrzmiały wykazywały przerwanie ciągłości ich błon (wewnętrznej i zewnętrznej). Zwykle w tak zmienionych mitochondriach występowały figury mielinowe (ryc. 6). Równocześnie ze zmianami błon szorstkich i mitochondriów obserwowano zwiększenie ilości kropli tłuszczowych i prawie całkowity zanik cząsteczek glikogenu.

Natomiast w hepatocytach strefy pośredniej stwierdzono wyraźne zmiany w RER. Stopień nasilenia tych zmian był wyższy niż po tym samym czasie działania samego  $\text{CCl}_4$ .

Po 4 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę indukowaną fenobarbitem liczne hepatocyty strefy centralnej zrazika wykazywały cechy martwicy skrzepowej i rozplywnej. Natomiast hepatocyty strefy pośredniej wykazywały zwyrodnienie wodniczkowe o różnym stopniu nasilenia. W strefie brzeżnej zrazika, niektóre hepatocyty wykazywały zaawansowaną degranulację RER.

Po 6 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę stwierdzono większe nasilenie zmian wstecznych w całym zraziku. Martwicą objęte były hepatocyty strefy centralnej i częściowo pośredniej. Pozostałe hepatocyty strefy pośredniej zrazika wykazywały zaawansowane zmiany o charakterze zwyrodnienia wodniczkowego i stłuszczenia, natomiast hepatocyty strefy brzeżnej wykazywały mozaikę zmian wczesnego uszkodzenia i znacznie zaawansowanego zwyrodnienia tłuszczowego.

#### DYSKUSJA

Ze zjawiskiem biotransformacji niektórych związków chemicznych w siateczce śródplazmatycznej hepatocytu oraz jej indukcją enzymatyczną wiąże się zagadnienie interakcji wprowadzonych do ustroju leków. W odniesieniu do komórki wątrobowej szczególnie interesujące jest zjawisko interakcji na poziomie metabolicznym, zwłaszcza w połączeniu z indukcją enzymatyczną w zdrowej i uszkodzonej wątrobie (4). Zgodnie z współcześnie panującym poglądem biotransformacja  $\text{CCl}_4$  do wolnego rodnika trójchlorometylu ( $\cdot\text{CCl}_3$ ), odpowiedzialnego za efekty hepatotoksyczne, zachodzi przy współudziale układu enzymatycznego metabolizującego leki, zależnego od cytochromu P-450 (1, 9, 16). Reakcje z udziałem wolnych rodników zachodzą w warunkach fizjologicznych i patologicznych (8). Powszechnie ustalono, że formy wolnorodnikowe znajdują się pod kontrolą szeregu układów, z których układ antyutleniaczy jest jednym z najważniejszych. W wątrobie naturalną funkcję antyutleniacza spełnia zredukowana forma glutationu (8). W uszkodzonym przez  $\text{CCl}_4$  hepatocycie prawdopodobnie zawodzą mechanizmy obronne przeciwstawne procesom utleniania, a zainicjowany przez wolny rodnik  $\cdot\text{CCl}_3$  nieodwracalny i postępujący proces peroksydacji fosfolipidów struktur błoniastych hepatocytu zaburza prawidłowy metabolizm komórki, doprowadzając przez to do jej zwyrodnienia i martwicy. Istnieje w piśmiennictwie cały szereg badań biochemicznych potwierdzających wiodącą rolę peroksydacji lipidów w uszkodzeniu hepatocytu (3, 12, 16). Wyniki badań doświadczalnych Perrissouda (11), prowadzonych z izolowanymi hepatocytami poddanymi działaniu  $\text{CCl}_4$ , wskazują, że  $\text{CCl}_4$  pierwszoplanowo uszkadza błonę komórkową hepatocytu, a następnie siateczkę śródplazmatyczną, aparat Golgiego i mitochondria. Cytowane wyniki badań Perrissouda (11)

sugerują, że niezmetabolizowany  $\text{CCl}_4$  może wywołać bezpośrednie efekty toksyczne, zmieniając przepuszczalność błony komórkowej hepatocytu lub też, co jest bardziej prawdopodobne,  $\text{CCl}_4$  może być metabolizowany do wolnych rodników zarówno w błonie komórkowej, jak i w siateczce śródplazmatycznej hepatocytu. Podobnie jak inni autorzy (2, 5, 9, 13, 14), my również nie wykazaliśmy ewidentnego uszkodzenia błony komórkowej hepatocytów po zastosowaniu  $\text{CCl}_4$  *in vivo*. Nie wyklucza to jednak możliwości udziału błony komórkowej w inicjacji uszkodzenia hepatocytu przez  $\text{CCl}_4$ , jak też wstępnej jego biotransformacji do wolnych rodników  $\cdot\text{CCl}_3$ . Innym dowodem przemawiającym za udziałem peroksydacji lipidów w mechanizmie hepatotoksycznego działania  $\text{CCl}_4$  jest zwiększona produkcja aldehydu dwumalonowego u zwierząt uprzednio stymulowanych fenobarbitem (16), co przemawia za tym, że fenobarbital indukując syntezę enzymów metabolizujących leki przyspiesza peroksydację lipidów strukturalnych hepatocytów po podaniu zwierzętom  $\text{CCl}_4$ .

W naszych badaniach submikroskopowych u zwierząt uprzednio stymulowanych fenobarbitem hepatocyty strefy centralnej zrazika wykazywały dużą ilość gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Podobne dane są przedstawione przez innych autorów, którzy stosowali taką samą dawkę fenobarbitalu (2). Podobnie jak inni autorzy, nie stwierdziliśmy zmian w innych organellach hepatocytów po indukcji fenobarbitem. Najwcześniejsze zmiany submikroskopowe hepatocytów w postaci degranulacji RER były obserwowane u zwierząt uprzednio stymulowanych fenobarbitem już po 20 min. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę, a w grupie po samym  $\text{CCl}_4$  dopiero po 30 min. Zmiany te polegały na zmniejszeniu się liczby rybosomów na powierzchni błon szorstkich i zwiększeniu się ich liczby w hialoplazmie. Zmiany te były obserwowane także przez innych autorów, ale w czasie nieco dłuższym — 30–60 min. (2, 5, 14), przy zastosowaniu większej dawki  $\text{CCl}_4$  (0,25 ml/100 g c.c. zwierzęcia). Według Smucklera (14) proces odklejania rybosomów od powierzchni błon RER pod wpływem  $\text{CCl}_4$ , łącznie z rozpadem polirybosomów i monomerów rybosomalnych świadczy o zaburzeniu przez  $\text{CCl}_4$  syntezy białek. Smuckler (14) wykazał, że  $\text{CCl}_4$  w układzie *in vivo* powoduje 50% zmniejszenie wbudowywania aminokwasów do białek w porównaniu z danymi uzyskanymi u zwierząt kontrolnych. W układzie *in vitro* różnice te wynoszą ok. 85%. Ten sam autor uważa, że zmiany czynnościowe są wynikiem zmian strukturalnych powstałych po zadziałaniu  $\text{CCl}_4$ . Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest zmniejszona liczba rybosomów o stałej sedymentacji 80 S z równoczesnym zwiększeniem ilości podjednostek o stałej sedymentacji 54 S. Natomiast F a r b e r (5) uważa, że zmiany w strukturalnych lipidach siateczki śródplazmatycznej spowodowane przez wolne rodniki  $\cdot\text{CCl}_3$  zmieniają funkcję błon, czego skutkiem jest inaktywacja G-6-P-azy oraz odłączenie się rybosomów od powierzchni RER i rozpad polisomów, co prowadzi do hamowania syntezy białek.

Zmiany początkowo obserwowane w pojedynczych hepatocytach strefy centralnej zrazika z czasem nasilały się. Polegały one na dalszej degranulacji RER oraz na poszerzeniu i fragmentacji jej kanałów. Po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę indukowaną fenobarbitem w sąsiedztwie poszerzonych kanałów RER obserwowano zwiększoną ilość SER. Tworzyły one ogniskowe skupienia na terenie cytoplazmy hepatocytu, miały zatartą strukturę i zmniejszoną średnicę pęcherzyków. Zmiana ta najwcześniej uwidaczniała się po 2 godz. działania samego  $\text{CCl}_4$ . Dane te pozwalają przypuszczać, że ujawniony w badaniach ultrastrukturalnych nadmiar SER jest wynikiem degranulacji RER pod wpływem toksycznego działania  $\text{CCl}_4$ . Wyniki te są zgodne z danymi opisanymi wcześniej przez innych autorów (5, 11, 12, 14). W przeciwieństwie do nich Stenger (15) uważa, że pojawienie się zwiększonej ilości SER jest wynikiem indukującego działania tego związku na wątrobę. Reynold i wsp. (13) uważają, że SER skupiona w agregaty o zatartej strukturze i zmniejszonym świetle pęcherzyków jest następstwem denaturacji błon pod wpływem toksycznego działania  $\text{CCl}_4$  na hepatocyt.

Pojawienie się struktur mielinowych i zwiększonej liczby kropli tłuszczowych w hepatocytach strefy centralnej po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę uprzednio indukowaną fenobarbitem i po 2 godz. w grupie zwierząt po samym  $\text{CCl}_4$  przemawia za uszkodzeniem RER syntetyzującej białka, co z kolei prowadzi do zaburzenia syntezy lipoproteidów. Spostrzegane przez nas różnej wielkości krople tłuszczowe uważaliśmy za wykładniki zwyrodnienia tłuszczowego, a nie fizjologicznej akumulacji lipidów, ponieważ zmiany te nasilały się wraz z pojawieniem się innych wykładników świadczących o uszkodzeniu komórki. Nasze spostrzeżenia ultrastrukturalne odnośnie stłuszczenia hepatocytów zgadzały się z uzyskanymi przez nas wynikami reakcji histochemicznych na obecność lipidów (część I). W piśmiennictwie istnieje pogląd, że akumulacja tłuszczów w hepatocytach jest spowodowana obniżeniem syntezy lipoproteidów odpowiedzialnych za uwalnianie lipidów z komórki (6).

W naszych badaniach ultrastrukturalnych po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  na wątrobę indukowaną fenobarbitem i po 2 godz. działania samego  $\text{CCl}_4$  stwierdzono obrzęk mitochondrii, zanik ziarnistości mitochondrialnych i uszkodzenie błon mitochondrialnych. Wymienione zmiany w mitochondriach mogą świadczyć o znacznym zakłóceniu procesów tlenowej fosforylacji i postępowym zaburzeniu procesów energetycznych komórek. Obserwowane przez nas struktury mielinowe w obrębie mitochondriów i w kanałach siateczki śródplazmatycznej przemawiają za zaburzeniem w tych organellach przemiany fosfolipidów wywołanej działaniem  $\text{CCl}_4$  na hepatocyt. Zmiany w mitochondriach były bardziej nasilone w grupie zwierząt po indukcji fenobarbitem. Podobne zmiany w mitochondriach po działaniu  $\text{CCl}_4$  na wątrobę szczura były opisane przez innych autorów (7, 9). Stwierdzają oni, że zaburzona synteza białek i znacznie podwyższony poziom trójglicerydów w wątrobie są przyczyną zmian mor-

fologicznych w mitochondriach i zaburzonej ich funkcji. Zaburzenia bioenergetyki hepatocytów, prowadzące do zsynchronizowanego w czasie zmniejszonego wytwarzania ATP-azy (część I), indukują wnikanie do komórki jonów sodu i wody na skutek dyskorelacji działania pompy sodowo-potasowej. Morfologicznym dowodem zmienionej bioenergetyki hepatocytów jest także, obserwowane przez nas w badaniach histochemicznych (część I), postępujące w czasie wykorzystanie przez hepatocyt zasobów glikogenu, co świadczy o uzyskiwaniu energii na drodze beztlenowej glikolizy i może być wyrazem przystosowania hepatocytu do istniejących niedoborów energetycznych. Wydaje się, że niedobory energetyczne powodują i nasilają zwyrodnienie wodniczkowe i stłuszczenie hepatocytów, a także wywołują ich martwicę. Zróżnicowany obraz ultrastrukturalny obumierających i martwiczych hepatocytów może być wypadkową działania złożonych mechanizmów uszkodzających i adaptacyjnych.

Przedstawione wyniki naszych badań potwierdzają znaczenie i wartość indukcji enzymatycznej siateczki śródplazmatycznej hepatocytów w interakcji różnych stosowanych leków (4), ponieważ zmiany ultrastrukturalne w grupie zwierząt po fenobarbitalu i  $\text{CCl}_4$  pojawiały się wcześniej i były bardziej nasilone niż zmiany obserwowane u szczurów otrzymujących tylko  $\text{CCl}_4$ .

Hepatocyty strefy centralnej zrazika okazały się bardziej wrażliwe na toksyczny wpływ  $\text{CCl}_4$  niż hepatocyty stref odległych od żyły centralnej zrazika z uwagi na zwiększoną ilość błon gładkich. Biorąc pod uwagę fakt, że największą zawartość cytochromu P-450 stwierdzono w hepatocytach strefy centralnej zrazika (10), a w naszym doświadczeniu hepatocyty tej strefy wykazały wysoki stopień uszkodzenia po podaniu zwierzętom  $\text{CCl}_4$ , należy przypuszczać, że zwiększona zawartość cytochromu P-450 po indukcji fenobarbitalem sprzyja szybszemu metabolizowaniu  $\text{CCl}_4$  do jego toksycznych produktów inicjujących łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów struktur błoniastych.

## Wnioski

1. Fenobarbital powoduje wczesne i intensywne wystąpienie zmian ultrastrukturalnych w hepatocytach.

2. Najwcześniejszą zmianą submikroskopową obserwowaną w hepatocytach jest degranulacja RER zarówno pod wpływem indukcji fenobarbitalem, jak i samego  $\text{CCl}_4$ .

3. Najwcześniejsze morfologiczne wykładniki toksycznego działania  $\text{CCl}_4$  występują w strefie centralnej zrazika, a następnie ujawniają się w hepatocytach odległych od żyły centralnej.

4. Późniejsze zmiany w hepatocytach występujące pod wpływem  $\text{CCl}_4$ , takie jak uszkodzenie mitochondriów i zwiększona w hialoplazmie ilość lipidów, są uwarunkowane efektem hepatotoksycznym  $\text{CCl}_4$ , powodującym zaburzenia działania pompy Na/K, syntezy białek i lipoproteidów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bartłomowicz B.: Wątrobowy cytochrom P-450. *Post. Biochem.* **32**, 459, 1986.
2. Chopra M. D. i wsp.: Mechanism of Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity. A Vivo Study of Its Molecular Basis in Rats and Monkeys. *Lab. Invest.* **26**, 716, 1972.
3. Cluet J. i wsp.: Effect of Pretreatment with Cimetidine on Phenobarbital on Lipoperoxidation in Carbon Tetrachloride and Trichloroethylene Dosed Rats. *Toxicology* **38**, 91, 1986.
4. Czarniecki J.: Badania doświadczalne nad interakcją leków i indukcją enzymatyczną wątroby zdrowych szczurów i szczurów po przewlekłym zatruciu 4-chlorkiem węgla. Rozprawa habilitacyjna, Lublin 1978.
5. Farber E. i wsp.: Dissociation of Effects on Protein Synthesis and Ribosomes from Membrane Changes Induced by Carbon Tetrachloride. *Amer. J. Pathol.* **64**, 601, 1971.
6. Gohbięrg S. Ł. i wsp.: Wlijanije niekatorych ekstrimalnych wozdiejstwij na submikroskopiczskuju organizaciju pieczeni krysz pri otrawlenii czetyrichchloristym uglerodom. *Biul. Eksp. Bioł. Mied.* **10**, 498, 1978.
7. Johannessen V. J.: *Electron Microscopy in Human Medicine* Mc-Graw-Hill. International Book Company, London 1978, 2, 19, 39, 113.
8. Kanclerz A., Zbytniewski Z.: Wolne rodniki w fizjologii i patologii organizmu. *Post. Hig. Med. Dośw.* **32**, 177, 1978.
9. Nayak N. C. i wsp.: Diverse Mechanisms of Hepatocellular Injuries Due to Chemicals: Evidence in Rats Administered Carbon Tetrachloride of Dimethylnitrosamine. *Br. J. Exp. Pathol.* **56**, 103, 1975.
10. Panin L. E., Usynin I. F.: Indukcja cytochromow P-450 i b<sub>5</sub> w subpopulacjach gępatocytow fienobarbitalom. *Biul. Eksp. Bioł. Mied.* **6**, 695, 1986.
11. Perrissoud D. i wsp.: The Effect of Carbon Tetrachloride on Isolated Rat Hepatocytes. Early Morphological Alterations of the Plasma Membrane. *Virch. Arch. B.* **35**, 83, 1981.
12. Reckangel R. O. i wsp.: New Perspectives in the Study of Experimental Carbon Tetrachloride Liver Injury. *The Liver*. Baltimore 1973, chapter 8, 150.
13. Reynolds E. S., Ree H. J.: Liver Parenchymal Cell Injury Carbon Tetrachloride. *Lab. Invest.* **25**, 269, 1971.
14. Smuckler E. A.: Alterations Produced in the Endoplasmic Reticulum by Carbon Tetrachloride. *Panminerva Medica* **18**, 292, 1976.
15. Stenger R. J.: Organelle Pathology of the Liver. *The Endoplasmic Reticulum Gastroenterol.* **58**, 554, 1970.
16. Weddle Ch. C. i wsp.: Lipid Peroxidation and Alteration of Membrane Lipids in Isolated Hepatocytes Exposed to Carbon Tetrachloride. *J. Biol. Chem.* **251**, 4973, 1976.

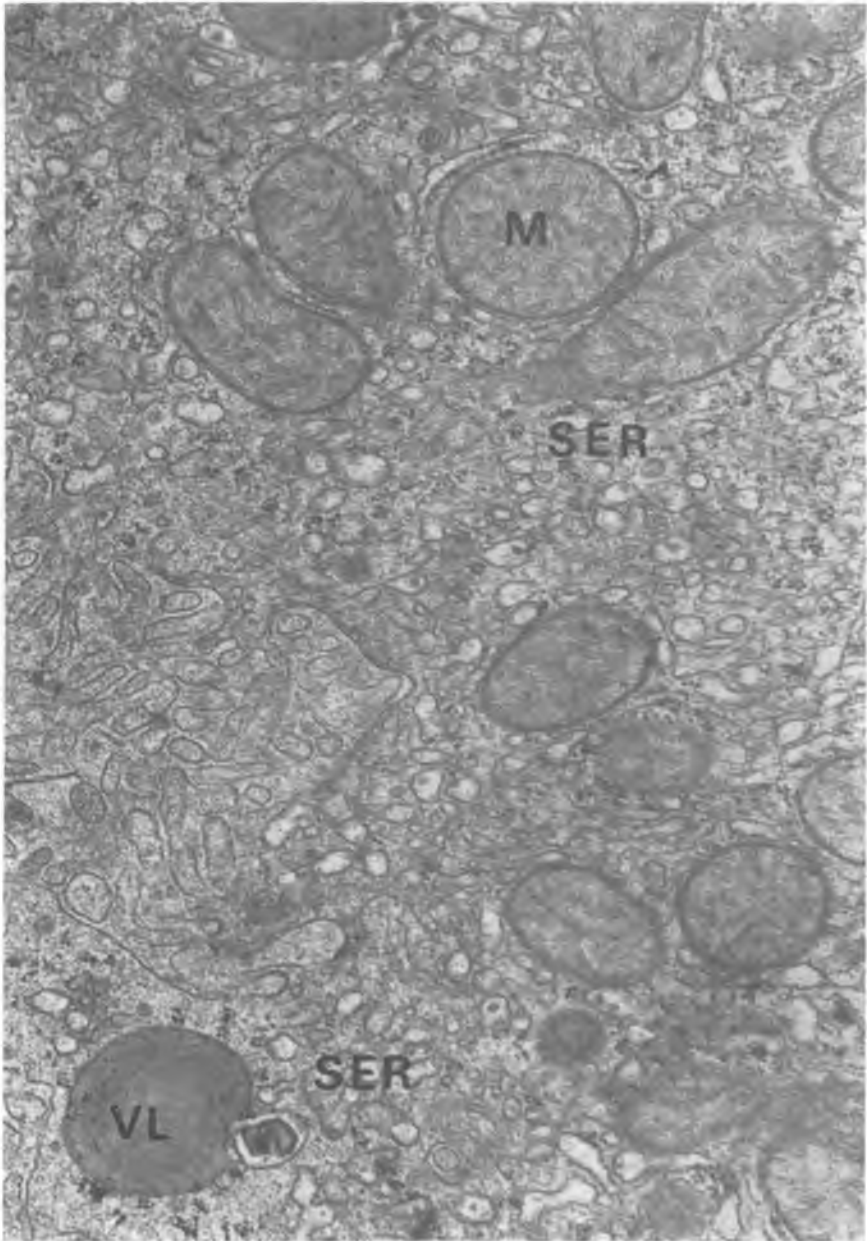
Otrzymano 1988.10.28.

## OBJAŚNIENIA RYCIN

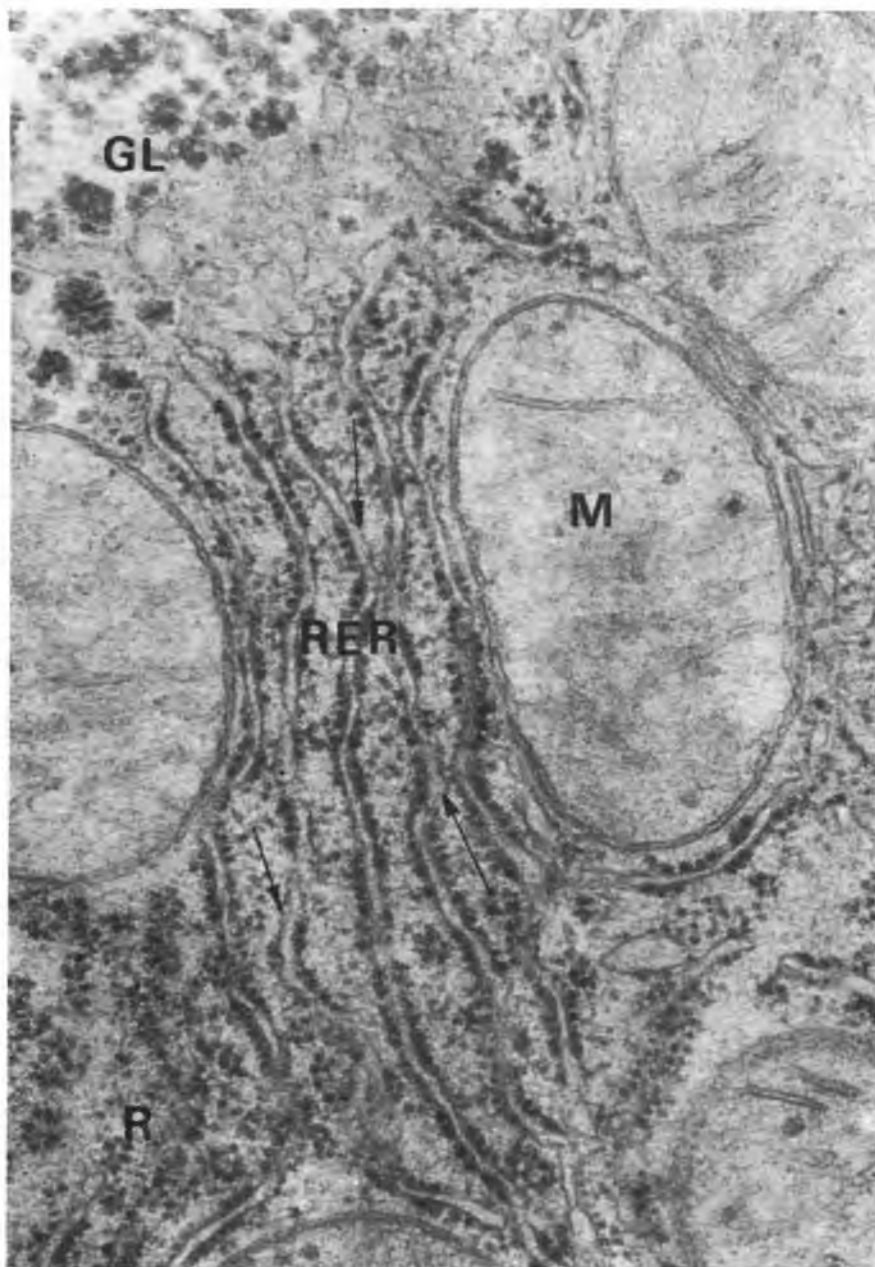
Ryc. 1. Biegun naczyńniowy hepatocytu strefy centralnej (grupa II kontrolna). Liczne pęcherzyki gładkiej siateczki śródplazmatycznej zajmują duży obszar cytoplazmy hepatocytu po indukcji fenobarbitem. W sąsiedztwie nie zmienione mitochondria (M) oraz wakuole lipidowe (VL). Pow. całk. 30 000 ×.

Ryc. 2. Fragment hepatocytu strefy centralnej po 20 min. działania CCl<sub>4</sub> (grupa II doświadczalna). Degranulacja (strzałki) ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (RER). Mitochondria (M) wykazują niewielkie przejaśnienia macierzy. Skupienia rybosomów (R). Częsteczki glikogenu (GL). Pow. całk. 72 000 ×.

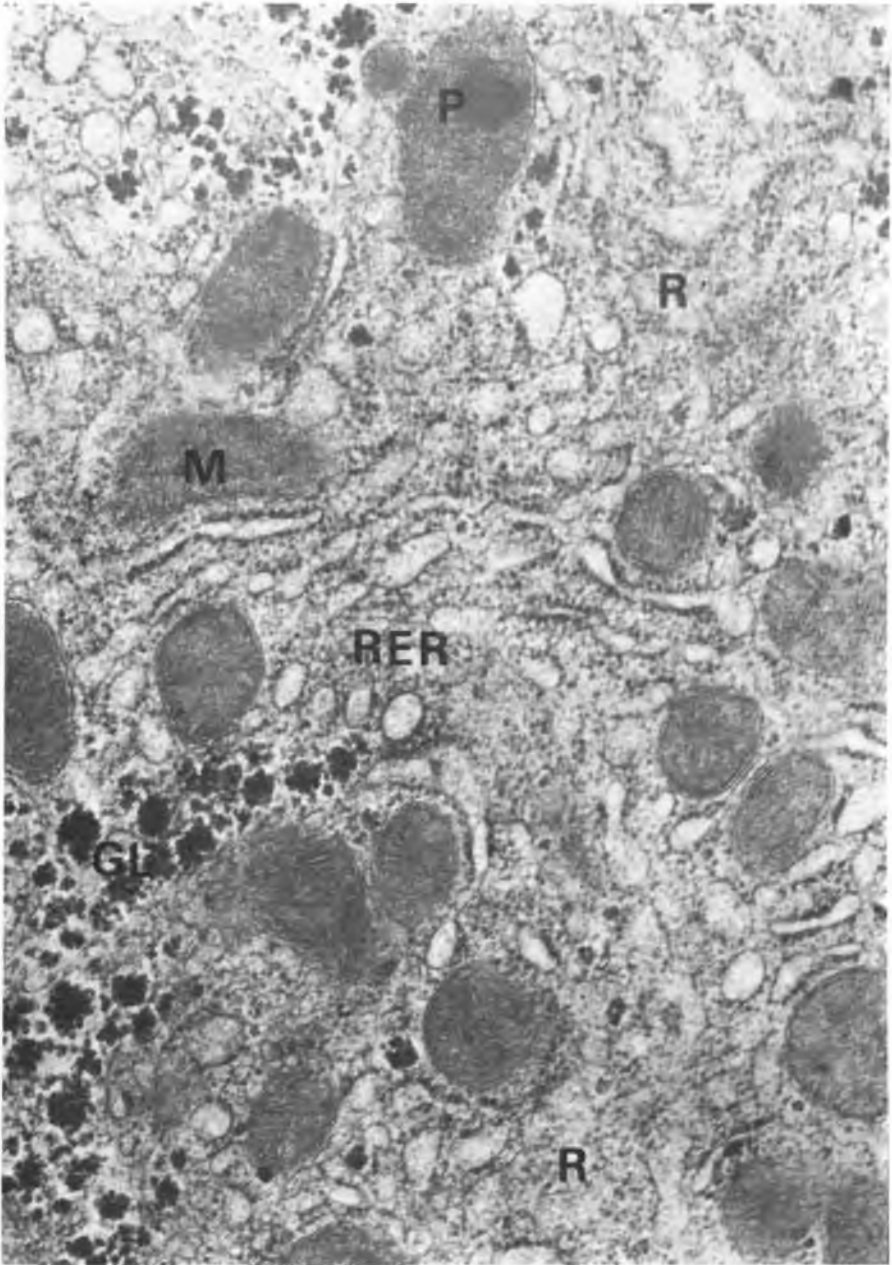




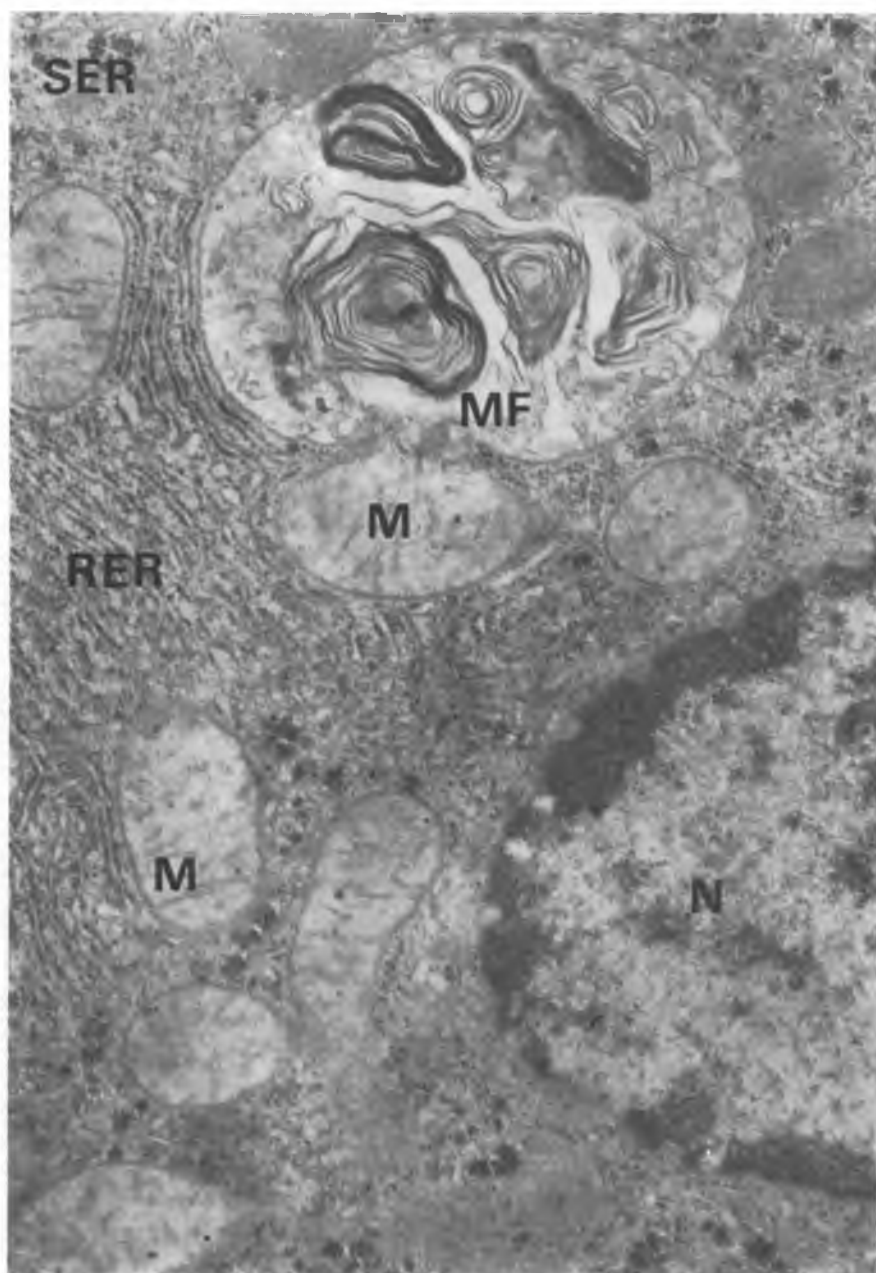
Ryc. 1



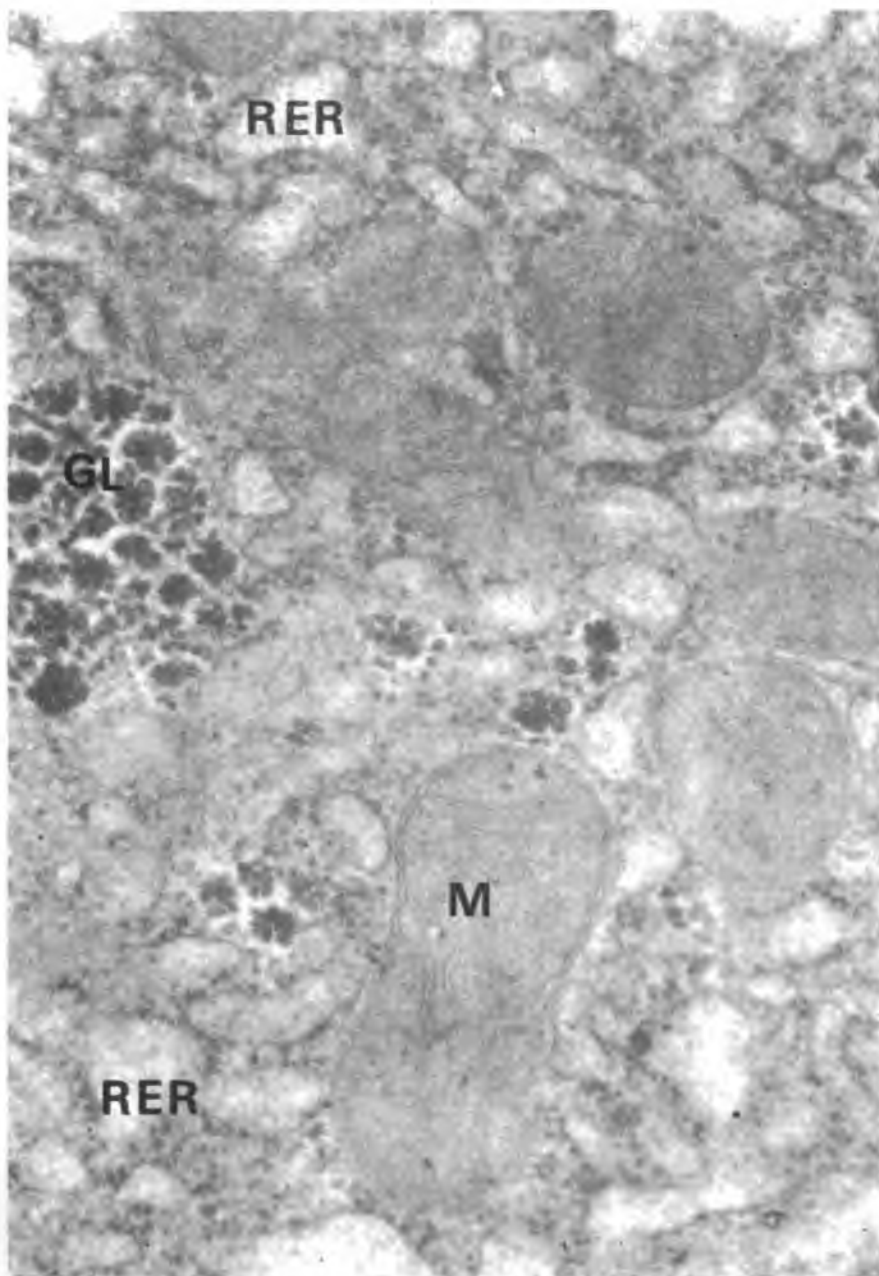
Ryc. 2



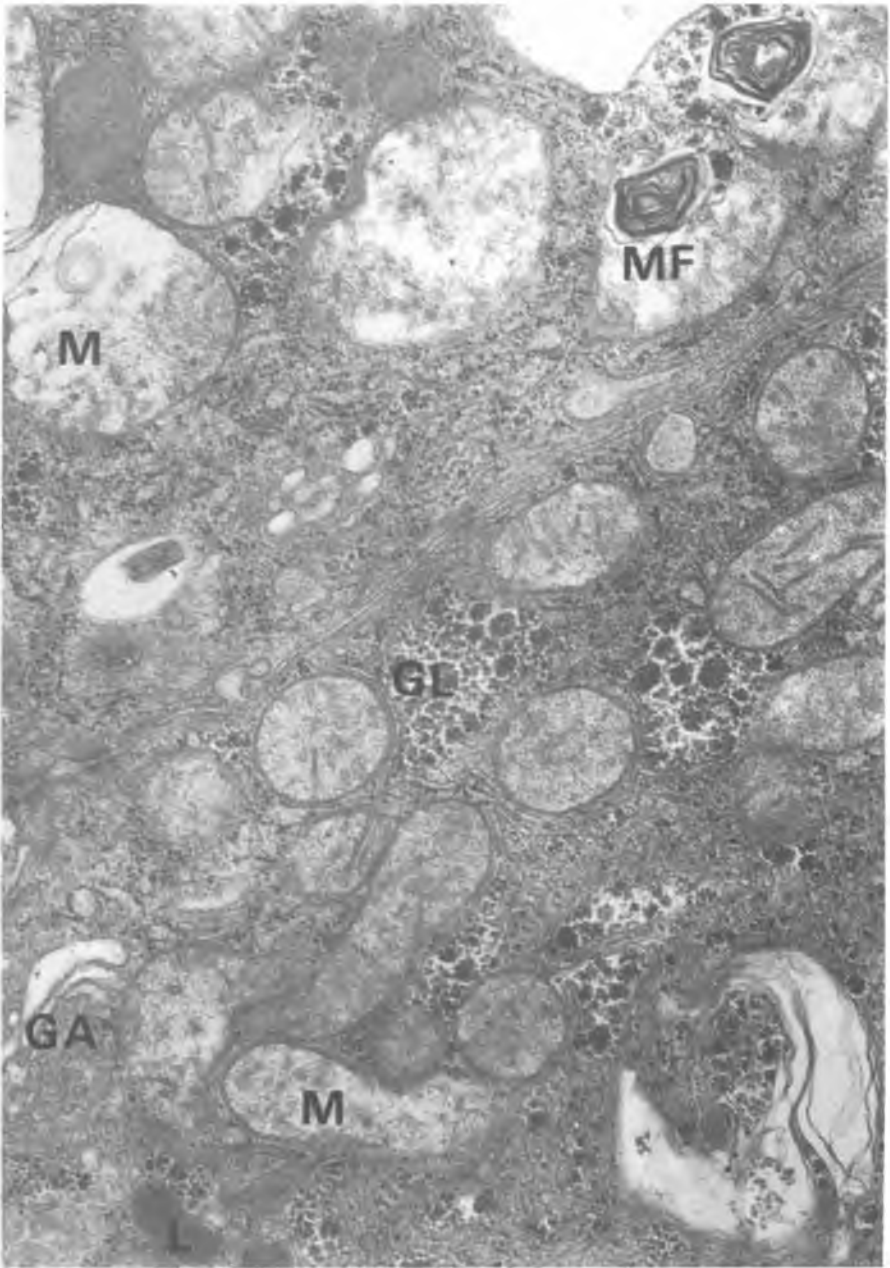
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

Ryc. 3. Fragment hepatocytu strefy centralnej zrazika po 1 godz. działania  $\text{CCl}_4$  (grupa I doświadczalna). Poszerzenie i fragmentacja ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (RER). Mitochondria (M) o zagęszczonej macierzy. Skupienia rybosomów (R) i glikogenu (GL). Pow. całk. 42 000  $\times$ .

Ryc. 4. Hepatocyt strefy centralnej zrazika po 4 godz. działania  $\text{CCl}_4$  (grupa I doświadczalna). W bliskim sąsiedztwie uszkodzonego mitochondrium (M) wakuola wypełniona figurami mielinowymi (MF). Jądro komórkowe (N) o niewyraźnym obrysie otoczki z brzezną kondensacją chromatyny. Kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (RER) z degranulacją, poszerzeniem i fragmentacją błon. W sąsiedztwie gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) nieliczne cząsteczki glikogenu (GL). Pow. całk. 30 000  $\times$ .

Ryc. 5. Działanie  $\text{CCl}_4$  w czasie 1 godz. na wątrobę indukowaną fenobarbitem. Fragment hepatocytu ze strefy centralnej zrazika. Nasilonej degranulacji (RER) towarzyszy poszerzenie jej kanałów dużego stopnia. Struktury błon tej sieci są zatarte. Ogniskowe skupienia cząsteczek glikogenu (GL). Mitochondria (M) o różnym przekroju. Pow. całk. 72 000  $\times$ .

Ryc. 6. Działanie  $\text{CCl}_4$  w czasie 2 godz. na wątrobę indukowaną fenobarbitem. Mitochondria (M) wykazują cechy daleko zaawansowanego obrzęku. Niektóre z nich mają przerwana błonę zewnętrzną, inne wykazują w swej macierzy figury mielinowe, a jeszcze inne tworzą wakuole, w których widoczne są fragmenty grzebieni. Nieliczne kanały RER z cechami degranulacji. Liczne pęcherzyki gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) rozdzielone cząsteczkami glikogenu (GL). Cysterny aparatu Golgiego (GA) poszerzone i pozbawione zawartości. L — lizosomy pierwotne. Pow. całk. 30 000  $\times$ .

#### OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW

ER	— siateczka śródplazmatyczna	VL	— kropla tłuszczu
RER	— ziarnista siateczka śródplazmatyczna	P	— mikrociałka
SER	— gładka siateczka śródplazmatyczna	N	— jądro komórkowe
M	— mitochondria	MF	— figury mielinowe
GA	— aparat Golgiego	GL	— cząsteczki glikogenu
		L	— lizosomy

#### РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние Фенобарбитала на поведение субмикроскопических изменений в печени крыс поврежденных  $\text{CCl}_4$ . Крысы-самцы штамма Вистар получали брюшинно Фенобарбитал в дозе 10 мг/100 г в.т. в течение пяти очередных дней. Одну дозу  $\text{CCl}_4$  (0,1 мл/100 г в.т.) подано в желудок вместе с парафиновым маслом. Микроскопическо-электронная оценка гепацитов показала, что у крыс индуцированных Фенобарбиталом ультраструктуральные изменения выступают очень рано и бывают более интенсивные, чем изменения вызванные  $\text{CCl}_4$ . Субмикроскопические изменения в самом начале выступили в гепацитах центральной зоны дольки и проявлялись в: дегранулировании зернистости внутриплазматической сеточки, повреждении митохондрий, расширении пузырьков каналов внутриплазматической сеточки, ожирении и некрозе. Деградацию внутриплазматической сеточки гепацитов можно объяснить пероксидазой липидов структуральных перепон через освобожденный радикал  $\text{CCl}_3$  во время биотрансформации  $\text{CCl}_4$  через микросомальную систему энзимов метаболизирующих лекарства (MFO) зависимый от цитохрома P-450.

## SUMMARY

The effect of phenobarbital on the behaviour of submicroscopic changes in rat's liver subjected to the action of  $\text{CCl}_4$  was studied. Male rats of Wistar strain were administered phenobarbital intraperitoneally in dose 10 mg/100 g of body weight for five successive days. A single dose of  $\text{CCl}_4$ , 0.1 ml/100 g of body weight was administered intragastrically in paraffin oil. On the basis of microscopic-electronic evaluation of hepatocytes it was found that in rats induced with phenobarbital ultrastructural changes occur earlier and are more intensified than those after the very  $\text{CCl}_4$ . Submicroscopic changes have most early appeared in hepatocytes of the central zone of lobule and they consisted in: degranulation of the rough endoplasmic reticulum, damage of mitochondria, broadening of canals of endoplasmic reticulum, fatty degeneration and necrosis. Degradation of interplasmic reticulum of hepatocytes may be explained through peroxidase of lipids of structural membranes by liberated radical  $\cdot\text{CCl}_3$  during biotransformation of  $\text{CCl}_4$  by microsomal system of enzymes metabolizing drugs (MFO) depending on cytochrome P-450.

## EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Vascular pole of hepatocyte of central zone (II<sup>nd</sup> control group). Numerous vesicles of smooth endoplasmic reticulum cover large areas of hepatocyte cytoplasm after induction with phenobarbital. In their nearness unchanged mitochondria (M) and lipid vasculcs (VL). Total magn. 30,000  $\times$ .

Fig. 2. Fragment of hepatocyte of central zone after 20 min of  $\text{CCl}_4$  action (II<sup>nd</sup> experimental group). Degranulation (arrows) of rough endoplasmic reticulum (RER). Mitochondria (M) show slight clearing up of matrix. Concentrates of ribosomes (R). Glycogen molecules (GL). Total magn. 72,000  $\times$ .

Fig. 3. Fragment of hepatocyte of central lobular zone after 1 hr action of  $\text{CCl}_4$  (I<sup>st</sup> experimental group). Broadening and fragmentation of rough endoplasmic reticulum (RER). Mitochondria (M) with condensed matrix. Concentrates of ribosomes (R) and glycogen (GL). Total magn. 42,000  $\times$ .

Fig. 4. Hepatocyte of central lobular zone after 4 hrs action of  $\text{CCl}_4$  (I<sup>st</sup> experimental group). In close nearness of damaged mitochondrium (M) vacuole filled with myelin figures (V). Cellular nucleus (N) with indistinct contour of aureola with marginal condensation of chromatin. Canals of rough endoplasmic reticulum (RER) with degranulation, broadening and fragmentation of membranes. In the nearness of smooth endoplasmic reticulum (SER) not numerous glycogen molecules (GL). Total magn. 30,000  $\times$ .

Fig. 5. 1 hr action of  $\text{CCl}_4$  on liver induced with phenobarbital. Fragment of hepatocyte from central lobular zone. Intensified degranulation (RER) accompanied by broadening of its canals in large degree. Structures of reticular membranes are obscure. Focal concentrates of glycogen molecules (GL). Mitochondria (M) with different sections. Total magn. 72,000  $\times$ .

Fig. 6. 2 hrs of  $\text{CCl}_4$  action on liver induced with phenobarbital. Mitochondria (M) show features of far advanced oedema. Some of them have broken external membrane, others have myelin figures in their matrix, and still others form vacuoles in which fragments of crests are visible. Not numerous RER canals with features of degranulation. Numerous vesicles of smooth endoplasmic reticulum (SER) separated by glycogen molecules (GL). Cisterns of Golgi apparatus (GA) broadened and devoid of content. L --- primary lysosomes. Total magn. 30,000  $\times$ .



## EXPLANATION TO SYMBOLS

ER	— endoplasmic reticulum	VL	— adipose drops
RER	— rough endoplasmic reticulum	P	— microbodies
SER	— smooth endoplasmic reticulum	N	— nucleus
M	— mitochondria	MF	— myelin figures
GA	— Golgi apparatus	GL	— glycogen molecules
		L	— lysosomes

