

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XIX, 8

SECTIO D

1964

Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik nauk.: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Mahrburg

Michał GÓRSKI

**Histochemiczne i submikroskopowe zmiany w komórkach wątroby myszy
pod wpływem Dikumarolu**

**Гистохимические и субмикроскопические изменения
в клетках печени мыши под воздействием дикумарола**

**Histochemical and Submicroscopic Changes in the Liver Cells of Mice due
to Dicumarol**

W dostępnym piśmiennictwie spotkałem tylko nieliczne prace omawiające zmiany histologiczne, histochemiczne oraz zmiany w strukturze submikroskopowej, jakie można obserwować w niedoborze witaminy K lub pod wpływem jej antagonistów. Nie spotkałem jednak próby odniesienia tych zmian do „czasu protrombinowego”, próby odnalezienia morfologicznych odpowiedników przedłużenia czasu protrombinowego w niedoborze witaminy K. Celem pracy była więc próba znalezienia zależności w występowaniu zmian morfologicznych, histochemicznych oraz w strukturze submikroskopowej komórki wątroby od stopnia przedłużenia czasu protrombinowego pod wpływem dikumarolu, tj. antagonisty witaminy K.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniu użyto 36 myszy szczepu C₃H/He, obu płci, 3—4 miesięcznych. Wycinki pobrane z wątroby 14 zwierząt zostały przebadane przy użyciu mikroskopu elektronowego Elmi D₂ (C. Zeiss, Jena). Nie badano w mikroskopie elektronowym wątroby zwierząt, u których wystąpiła skaza krwotoczna. Zwierzętom podawano dikumarol (średnio 3—5 mg na 1 kg wagi). Po 7 i 28 dniach podawania oraz po 5 i 9 dniach po zakończeniu podawania dikumarolu zwierzęta zabijano przez dekapitację. Określano czas protrombinowy wg metody Quicka w modyfikacji Borowskiej.

Wątrobę utrwalano w obojętnej formalinie, w utrwalaczu wg Carnoya oraz wg Zenker-Helly. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną. Celem uwidocznienia mitochondriów, materiał utrwalony w płynie Zenker-Helly po odwodnieniu i zamknięciu w parafinie krajano na skrawki grubości około 5 μ , bejcowano w 5 % roztworze wodnym alunu amonowo-żelazowego i barwiono w hematoksylinie wg Regaut. Celem wykrycia DNA materiał utrwalony w płynie Carnoya barwiono wg metody Feulgena, wykonując preparaty próbne bez hydrolizy w kwasie solnym. Dla uwidocznienia RNA materiał barwiono wg metody Bracheta w modyfikacji Vorbrodta oraz przy pomocy 0,1 % roztworu błękitu toluidyny w buforze octanowym o pH 4,3. Równocześnie wykonywano preparaty kontrolne po godzinnym działaniu RN-azy w temperaturze 37°C. Celem wykrycia tłuszczu materiał utrwalony w obojętnej formalinie krajano na mikrotomie mrozeniowym i barwiono sudanem III. Materiał do badania w mikroskopie elektronowym utrwalano w 1 % roztworze czterotlenku osmu zbuforowanym buforem octanowo-weronalowym o pH 7,4 w temperaturze 4°C przez okres pół godziny. Odwadniano w alkoholu etylowym o wzrastającym stężeniu. Odwodniony materiał zatapiało w mieszaninie metakrylanu butylu z metakrylanem metylu (w stosunku 9:1) 1 % dodatkiem nadtlenu benzoilu w temperaturze 45°C przez okres 24 godzin. Błoczki krajano nożem szklanym na ultramikrotomie OmU Reicherta uzyskując skrawki grubości około 300 Å. Skrawki oglądano w mikroskopie elektronowym Elmi D₂ C. Zeiss, Jena.

BADANIA WŁASNE

Zwyrodnienie mięszowe wątroby stwierdzono u wszystkich zwierząt, które przez 28 dni otrzymywały dikumarol. Było ono bardziej wyraźne u zwierząt ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym a wybitnie zaznaczone u zwierząt, u których wystąpiła skaza krwotoczna. Po 7 dniach podawania dikumarolu stwierdzono u 4 na 8 zwierząt zwyrodnienie mięszowe wątroby nieznaczne lub średniego stopnia. 5 dni po zaprzestaniu podawania dikumarolu zwyrodnienie mięszowe średniego stopnia stwierdzono tylko u jednego zwierzęcia a w 9 dni zwyrodnienia nie obserwowano.

W skrawkach barwionych sudanem III, jak również w skrawkach oglądanych w mikroskopie elektronowym stwierdzało się ogniskowo większe nagromadzenie tłuszczu w poszczególnych komórkach wątrobowych. Znaczniejszą zawartość tłuszczu spotkano u 3 zwierząt w grupie zwierząt karmionych przez 28 dni dikumarolem.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) dawał intensywne zabarwienie u wszystkich zwierząt, nieco słabsze odczyny wystąpiły u trzech zwierząt ze skazą krwotoczną. Odczyn na kwas rybonukleinowy (RNA) był słabszy u zwierząt po 28 dniach podawania dikumarolu, zwłaszcza ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym, nieco słabszy u niektórych zwierząt po 7-dniowym podawaniu dikumarolu. W 5 i 9 dni

po zaprzestaniu podawania dikumarolu nasilenie odczynu nie odbiegało od normy.

Mitochondria. U zwierząt kontrolnych na obwodzie zrazika wątroby w komórkach znajdowały się mitochondria okrągłe oraz pojedyncze pałeczki i nitki, ku środkowi zrazika zaś ilość okrągłych mitochondriów zmniejszała się na korzyść form nitkowatych. Po siedmiodniowym podawaniu dikumarolu mitochondria okrągłe zajmowały nieco większą przestrzeń zrazika, a po 28 dniach zwłaszcza u zwierząt ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym formy te występowały prawie w całym zraziku. Po zaprzestaniu podawania dikumarolu wygląd mitochondriów powracał do normy.

W mikroskopie elektronowym u zwierząt kontrolnych mitochondria były podłużne, owalne i okrągłe o wyraźnych błonach zewnętrznych i wewnętrznych (*cristae mitochondriales*) (ryc. 1). U zwierząt karmionych dikumarolem zwłaszcza ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym występowały mitochondria obrzmiałe, przeważnie okrągłe lub owalne. Błony zewnętrzne niektórych mitochondriów były rozerwane, lub całkowicie niewidoczne, a pozbawione ich mitochondria rozpyływały się (ryc. 4, 5). Również w wielu mitochondriach błony wewnętrzne były nieliczne, krótkie (ryc. 2, 3).

W obrębie ergastoplazmy występowały wyraźne różnice u zwierząt karmionych dikumarolem ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym. U zwierząt tych przeważnie nie widziało się beleczkowego (lamellarnego) utkania ergastoplazmy. Belecзки ergastoplazmy były nieliczne, krótkie, z reguły nie przekraczały długości mitochondriów, wokół których były ułożone (ryc. 2—5). W wątrobie zwierząt kontrolnych i po zaprzestaniu podawania dikumarolu rysunek ergastoplazmy był wyraźny, formy lamellarne liczne, belecзки długie (ryc. 1, 6, 7, 8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

W doświadczeniu podawano zwierzętom antagonistę witaminy K — dikumarol oraz badano zależność zmian morfologicznych, histochemicznych, zmian w strukturze submikroskopowej w związku z przedłużeniem czasu protrombinowego. Po 7-dniowym podawaniu dikumarolu przedłużenie czasu protrombinowego było niewielkie, tylko w jednym wypadku przekraczało dwukrotnie prawidłowy czas protrombinowy. Również zmiany morfologiczne w tej grupie zwierząt były najsłabiej zaznaczone. Po 28-dniowym podawaniu dikumarolu przedłużenie czasu protrombinowego było znaczne, wyraźne były również zmiany morfologiczne. W 5 dni po zaprzestaniu podawania dikumarolu przedłużenie czasu protrombinowego było bardzo niewielkie. Obrazy morfologiczne w tych

Zestawienie wyników doświadczenia
Results of the experiment

Nr zwierzęcia	Wyszczególnienie pleć	Czas protomb.	Zwyrodnienie mięszone	Ilość tłuszczu	Kwas DRN wyraźny	Kwas RN wyraźny	Formy zarodniowe mit. zajął większy obszar zrazika	W mikroskopie elektronowym			Uwagi
								obrzęczenie mitochondr.	Zatarcie struktury mitochondr.	Zmniejszona ilość form beczkowych ergastoplazmy	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	kontrola	ż	16,0	—	+	+	—	—	—	—	
2	„	m	16,5	—	+	+	—	—	—	—	
3	„	m	19,5	—	—	+	+	—	—	—	
4	„	ż	19,5	—	—	+	+	—	—	—	
5	„	ż	19,0	—	—	+	+	—	—	—	
6	„	m	20,0	—	—	+	+	—	—	—	
7	7 dni	m	26,0	—	—	+	+	—	—	—	
8	dikumarol	ż	39,0	—	—	+	+	—	—	—	
9	„	ż	39,0	+	—	+	+	+	—	—	
10	„	m	55,0	+	—	+	+	+	+	+	
11	„	ż	38,0	—	—	+	+	+	—	—	
12	„	ż	39,0	+	+	+	—	—	—	—	
13	„	m	27,0	—	—	+	+	—	—	—	
14	„	m	33,0	+	—	+	+	+	—	—	
15	28 dni di-		32,5	+	++	+	—	+	+-	+-	+
16	kumarol		44,0	++	++	+	—	+	+	+	+
17	„	m	55,0	++	+-	+	—	+	+	+	+
18	„	m	2'43"	++	—	+	—	+	+	+	+
19	„	m	47,0	++	++	+	—	+-	+-	+	+
20	„	m	1'49"	++	+	+	—	+	+	+	+
21	„	ż	54,0	+	—	+	—	+-	—	—	
22	„	ż	48,0	+	+	+	+	+-	—	—	
23	„	ż	55,0	++	—	+	+	+	—	—	
24	„	ż	2'5"	++	+-	+	—	+	—	—	
25	„	m	1'30"	++	+-	+	—	+	—	—	
26	„	m	47,0	+	+	+	+	+-	—	—	
27	„	ż	4'36"	++	+	+	—	+	—	—	
28	„	ż	3'20"	++	+	+	—	+	—	—	skaza brwotoczeń
29	„	ż	3'48"	++	+	+	—	+	—	—	„
30	„	ż	4'10"	++	+-	+	—	+	—	—	„
31	„	ż	2'56"	++	+	+	—	+	—	—	„
32	5 dni po od-	m	27,0	—	—	+	+	—	—	—	
33	„	m	32,5	+-	—	+	—	—	—	+	
34	„	m	29,0	—	—	+	+	—	—	—	
35	9 dni po od-	m	16,0	—	—	+	+	—	—	—	
36	„	m	18,0	—	—	+	+	—	—	—	

przypadkach prawie nie odbiegały od normy. W 9 dni po zaprzestaniu podawania dikumarolu czas protrombinowy powrócił do normy a obrazy morfologiczne nie różniły się od kontrolnych.

Zwyrodnienie mięszkowe stwierdzono w większości przypadków, a zawsze stwierdzano je u zwierząt ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym. Równoległe ze zwyrodnieniem mięszkowym występowały zmiany w mitochondriach. U zwierząt ze znacznie przedłużonym czasem protrombinowym mitochondria okrągłe zajmowały całą przestrzeń zrazika, prawie całkowicie nie występowały formy nitkowate. Ta zbieżność występowania zwyrodnienia mięszkowego z obrzmieniem mitochondriów jest zgodna z poglądami Virchowa oraz pracami ostatnich lat Brauna i Ganslera, wg których przyczyną zwyrodnienia mięszkowego są głównie zmiany w mitochondriach (5, 7).

W mikroskopie elektronowym w przypadkach zwyrodnienia mięszkowego mitochondria mają wygląd obrzmiałych, jasnych, ubogich w wewnętrzne struktury (7). Drugą cechą występującą pod wpływem dikumarolu równoległe z przedłużeniem czasu protrombinowego jest mniejsza intensywność odczynów na kwas rybonukleinowy. Równocześnie w mikroskopie elektronowym widzimy zmiany w reticulum endoplazmatycznym — ergastoplazmie. U zwierząt, u których odczyn na kwas rybonukleinowy w komórkach wątroby był bardzo słaby, obserwowano się prawie całkowity brak beleczkowatej (lamellarnej) budowy reticulum endoplazmatycznego. Wg. Bracheta beleczkowate formy ergastoplazmy są nosicielami enzymów i metabolitów umiejscowionych w obrębie określonych rejonów komórki (4). Porter (wg 2) i Braun (5) widzą związek utkania beleczkowatego reticulum endoplazmatycznego gładkiego z metabolizmem glikogenu. Niektórzy autorzy jak Bernhard i Rouiller (wg 8) łączą tworzenie się tego rodzaju struktur ergastoplazmy z czynnością mitochondriów. Doświadczenia Borsoka (wg 8) z węglem C^{14} wykazują, że mitochondria mogą współdziałać z mikro-somami w procesie syntezy białka.

Kształt i rozmieszczenie mitochondriów w zraziku wątroby zmieniały się po karmieniu u zwierząt głodzonych (7), jak również pod wpływem szkodliwych bodźców — toksyn, promieni X i innych (5, 9). Dlatego nie można opisanych zmian uważać za patognomiczne dla działania dikumarolu. Zmiany w ultrastrukturze wyosobnionych mitochondriów pod wpływem dikumarolu oraz różnych innych czynników opisywało szereg badaczy, między innymi: Bargmann (1), Chappel (6). Obserwacje poczynione w naszych doświadczeniach rzucają pewne światło na morfologiczne odpowiedniki obniżenia poziomu protrombiny,

natomiast nie są w stanie odpowiedzieć na pytanie — czy protrombina jako α_2 globulina jest produkowana przez komórki wątrobowe, czy też przez układ siateczkowo-śródbłonkowy.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania nad doświadczalnie wywołaną pod wpływem dikumarolu awitaminozą K u myszy wykazały, że równolegle do przedłużonego czasu protrombinowego w komórkach wątroby występują następujące zmiany: a) obrzmienie mitochondriów i występowanie form okrągłych tych mitochondriów również w centrum zrazika, b) zmniejszenie ilości beleczkowatych form ergastoplazmy i c) mniej intensywny odczyn na kwas rybonukleinowy, przy zachowanym wyraźnym odczynie na kwas dezoksyrybonukleinowy.

2. Po zaprzestaniu podawania dikumarolu zmiany powyższe cofają się równolegle z normowaniem się czasu protrombinowego.

3. Wyrazem morfologicznym przedłużenia czasu protrombinowego pod wpływem dikumarolu w komórce wątroby jest obrzmienie mitochondriów i zmniejszenie ilości form beleczkowatych ergastoplazmy oraz jej fragmentacja.

PIŚMIENNICTWO

1. Bargmann W., Knoop A.: *Z. Zellforsch.* **51**, 456—466, 1960.
2. Brachet J.: *The Cell*, **1**, Acad. Press, New York and London 1959
3. Brachet J.: *Biochemical cytology*, **2**, 36—60, 1957.
4. Brachet J.: *The Cell*, **2**, Acad. Press, New York and London 1961.
5. Braun H.: *Naturwissenschaften*, **45**, 18, 1958.
6. Chappel J., Grevil G.: *Nature (London)* **184**, 1737—1738, 1959.
7. Green D.: *Radiat. Res. supp.* **2**, 504, 1960.
8. Kraczkiewicz Z.: *Cytologia ogólna*, Wyd. II, PWN, Łódź — Warszawa 1959.
9. Ross C., MacCardle Ph., Congdon C.: *Amer. J. Path.*, **31**, 725—745, 1955.

OPIS MIKROFOTOGRAFII

Ryc. 1. Wątroba myszy nr 3. Powiększenie około 8000 \times . Mitochondria podłużne o wyraźnych błonach zewnętrznych i wewnętrznych, liczne formy beleczkowe ergastoplazmy.

Ryc. 2 i 3. Wątroba myszy nr 20. Powiększenie około 8000 \times . Mitochondria obrzmiałe, w niektórych komórkach skupiają się w duże konglomeraty. Gładkie formy ergastoplazmy, niewidoczne. Na ryc. 2 widoczna komórka Browicz-Kupfera. Na ryc. 3 w świetle naczynia leukocyty.

Рис. 4 и 5. Powiększenie około 8000 X. Wątroba myszy nr 18. Mitochondria okrągłe, obrzmiałe, w wielu brak błony zewnętrznej i błon wewnętrznych, niektóre mitochondria rozplywają się.

Рис. 6. Wątroba myszy nr 33. Powiększenie ok. 8000 X. Obraz mitochondriów i ergastoplazmy prawidłowy.

Рис. 7 i 8. Wątroba myszy nr 34. Powiększenie około 8000 X. Obraz struktury submikroskopowej prawidłowy. Mitochondria o wyraźnym rysunku. Liczne formy beleczkowe ergastoplazmy. Na zdjęciu nr 8 komórka Browicz-Kupfera.

РЕЗЮМЕ

В результате ряда опытов автор вызывает у мышей относительный недостаток витамина „К” посредством дикумарола. Степень недостаточности определялась при помощи т.наз. „времени состояния протромбина”.

Одновременно с продолжением длительности т.наз. „времени состояния протромбина” в клетках печени усиливались изменения. Наблюдалось опухание митохондрий, ослабление реакции на кислоту рибонуклеиновую, уменьшение числа трабекул эргастоплазмы. Вышеуказанные изменения наступали с момента прекращения применения дикумарола при одновременной нормализации „времени состояния протромбина”.

Рис. 1. Печень мыши № 3. Увеличение около 8000 X. Митохондрии продолговатые с отчетливыми наружной и внутренней оболочками. Многие трабекулярные формы эргастоплазмы.

Рис. 2. и 3. Печень мыши № 20. Увеличение около 8000 X. Ясно выраженные митохондрии, отечные, в некоторых клетках видны конгломераты. Гладкие формы эргастоплазмы не наблюдаются. В рис. 2 клетка Брович-Купфера. В рис. 3 в просвете сосуда лейкоцит.

Рис. 4 и 5. Увеличение 8000 X. Печень мыши № 18. Митохондрии круглые, отчетливые, у некоторых из них отсутствуют наружные и внутренние оболочки, некоторые в расплывчатом состоянии.

Рис. 6. Печень мыши № 33. Увеличение около 8000 X. Митохондрии и эргастоплазма без видимых изменений.

Рис. 7 и 8. Печень мыши № 34. Увеличение около 8000 X. Субцеллюлярное структурное строение без изменений. Митохондрии достаточно отчетливы. Трабекулярные формы эргастоплазмы. На снимке № 8 клетка Брович-Купфера.

SUMMARY

The author produced a relative deficiency of Vitamin K in mice fed with dicumarol. The degree of the deficiency was estimated by means of the so-called prothrombine time. As the prothromine time

was prolonged, changes in the liver cell increased observed as swelling of mitochondria; also the intensity of the reaction on RNA weakened, the quantity of lamellar form of the ergastoplasm decreased. All these changes disappeared as soon as the application of dicumarol was stopped, and the prothrombine time became normal.

Fig. 1. Liver of mouse No. 3. Magn. ca 8 000 \times . Oblong mitochondria showing distinct boundaries of external and internal membranes with numerous lamellar forms of the ergastoplasm.

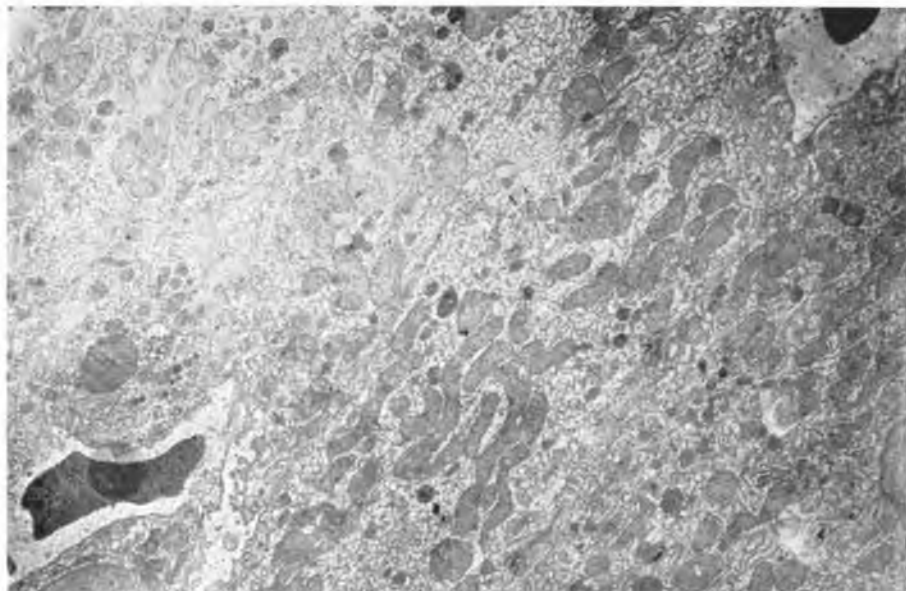
Fig. 2 and 3. Liver of mouse No. 20. Magn. ca. 8 000 \times . Swollen mitochondria in some cells form large conglomerations. Smooth forms of the ergastoplasm are not visible. In Fig. 2 Browicz-Kupfer's cells are visible. In Fig. 3 a leucocyte in the lumen of the vessel is visible.

Figs. 4 and 5. Liver of mouse No. 18. Magn. ca. 8 000 \times . Round swollen mitochondria, many of them lack external and internal membranes, some of them are disintegrated.

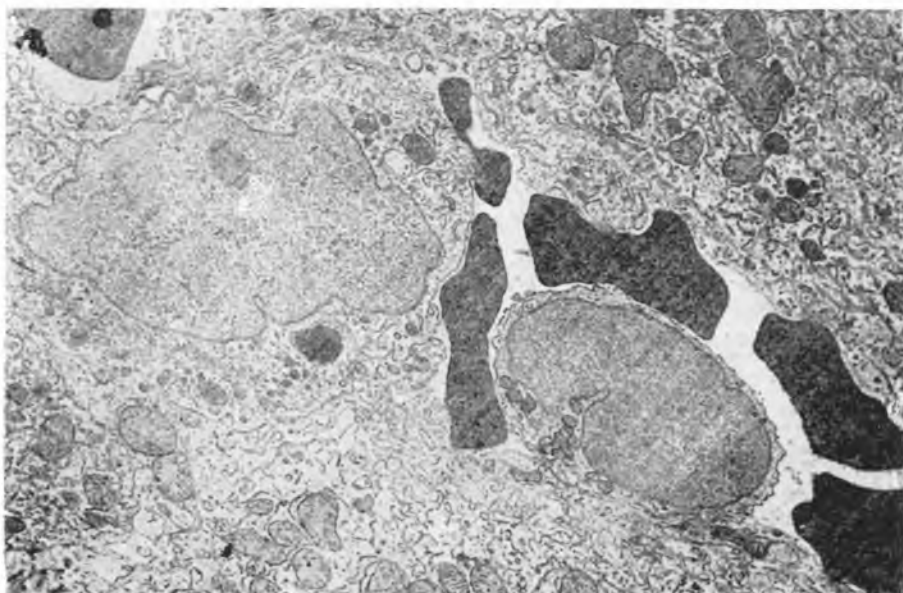
Fig. 6. Liver of mouse No. 33. Magn. ca. 8 000 \times . Normal picture of mitochondria and of the ergastoplasm.

Figs. 7 and 8. Liver of mouse No. 34. Magn. ca. 8 000 \times . Normal picture of the subcellular structure. Mitochondria are distinct. Numerous lamellar forms of the ergastoplasm. Fig. 8 presents Browicz-Kupfer's cell.

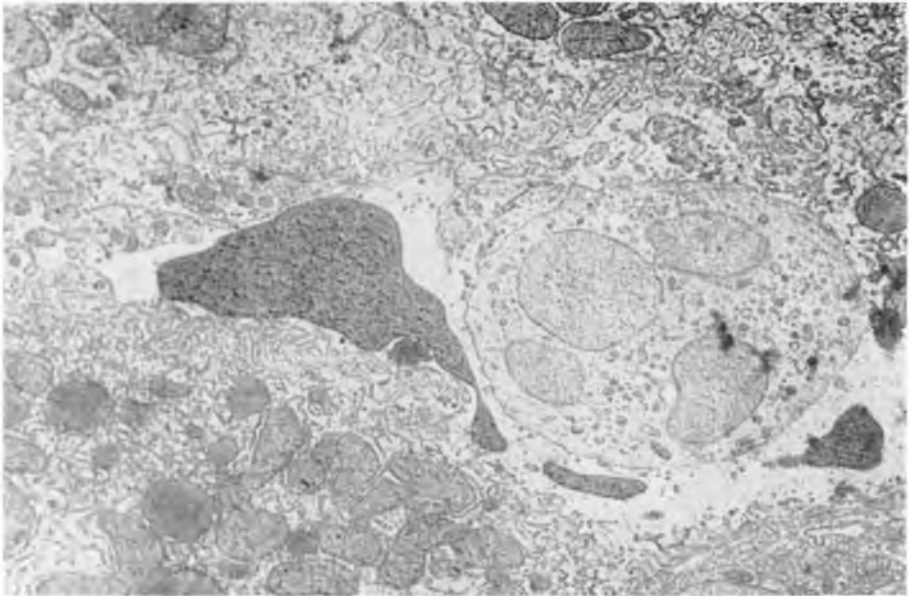
Pracę otrzymano 8 IV 1964.



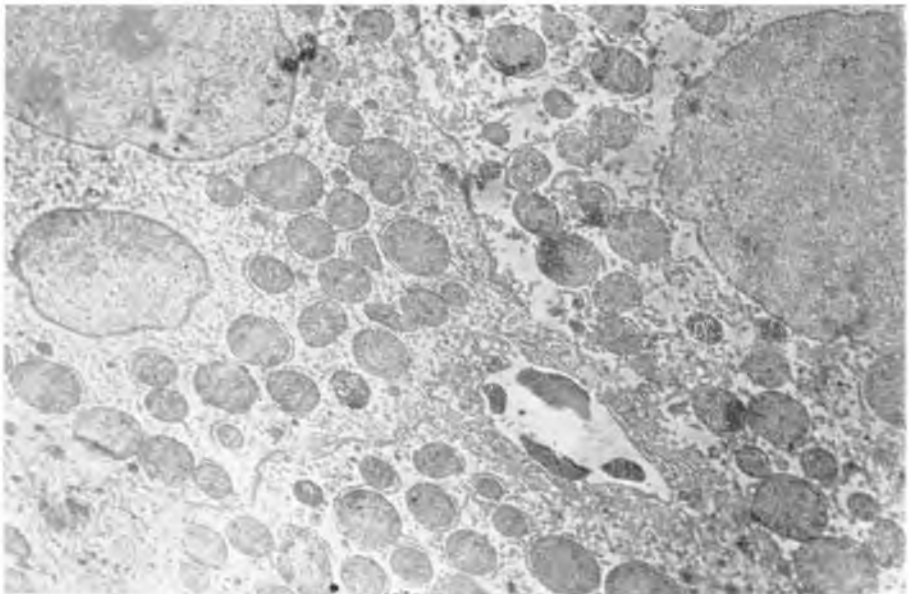
Ryc. 1



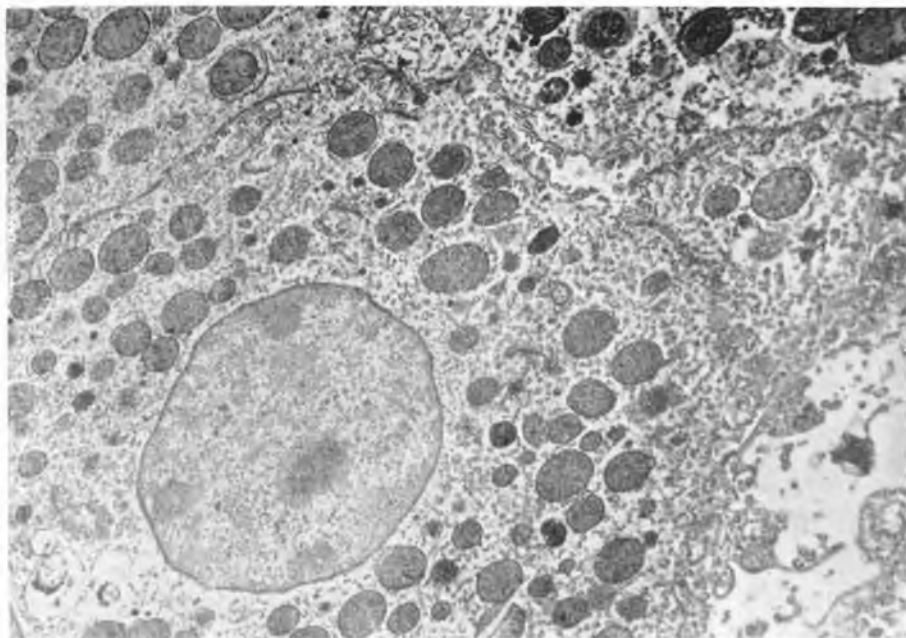
Ryc. 2



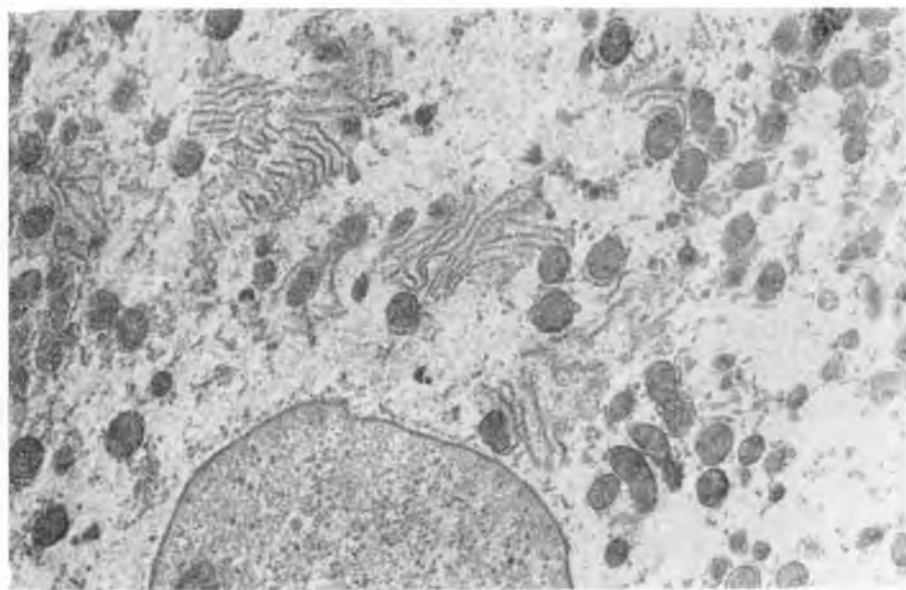
Ryc. 3



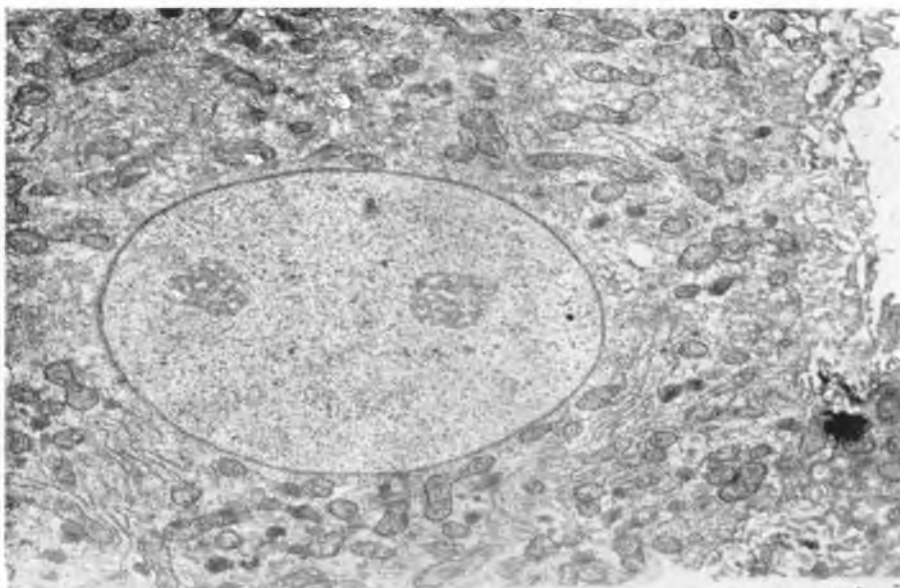
Ryc. 4



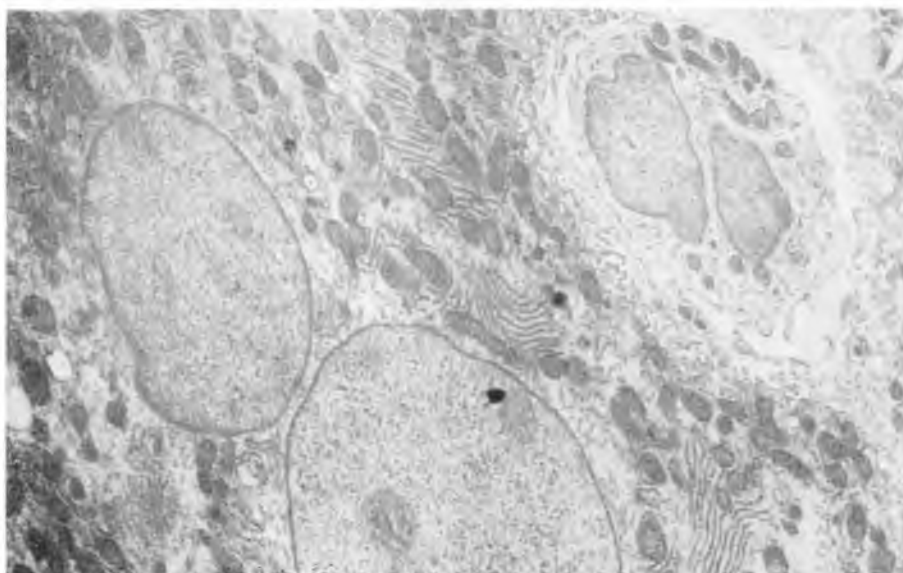
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8