

Katedra i I Klinika Chirurgiczna. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Tadeusz Jacyna-Onyszkiewicz
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Pracownia Mikroskopii Elektronowej.
Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Mirosław LITWIN

Zmiany ultrastruktury wątroby w przebiegu doświadczalnej niedrożności dróg żółciowych

Изменения ультраструктуры печеночных клеток во время экспериментальной непроходимости желчных путей

Ultrastructural Changes in the Hepatic Cells During the Experimental Obstructive Jaundice

Niedrożność wyprowadzających dróg żółciowych, niezależnie od pierwotnej przyczyny, powoduje wewnątrzwątrobowy zastój żółci, a w następstwie żółtaczkę mechaniczną. Dziś chirurga interesuje nie tylko techniczna strona zagadnienia, tzn. odtworzenie warunków dla swobodnego przepływu żółci, lecz również zagadnienia teoretyczne, związane z tą chorobą: zmiany w wątrobie i jej czynności, wpływ na pozostałe narządy i układy, wzajemna ich współzależność w przebiegu choroby.

Piśmiennictwo kliniczne obfituje w wielką liczbę prac, związanych z tym tematem i obejmuje zagadnienia zmian enzymatycznych, humoralnych, składu krwi, krzepliwości, krążenia i innych, związanych z żółtaczką mechaniczną zmian ustrojowych. Nie znajdując w polskim piśmiennictwie klinicznym badań omawiających zmiany ultrastruktury komórki wątrobowej w przebiegu żółtaczki mechanicznej, podjęliśmy próbę oceny zmian budowy komórki w żółtaczce mechanicznej, wywołanej doświadczalnie.

Zapoczątkowane w 1932 r. badania komórki wątroby po podwiązaniu przewodu żółciowego wykazały, że już po godzinie mogą rozpocząć się w komórce zmiany zwyrodnieniowe, które narastają w miarę upływu czasu. Badania mikroskopowo-elektronowe pozwoliły na odkrycie zmian w obrębie szorstkiej i gładkiej siatki śródplazmatycznej, zmian liczby i położenia lizosomów oraz mitochondriów (6). Zwrócono uwagę na wyraźne zwiększenie podziału komórek wątroby (mitozy) w przebiegu wewnątrzwątrobowego zastojów żółci (4). Podejmowane były również prace nad zmianami ultrastruktury wątroby w żółtaczkach niemechanicznego pochodzenia (2, 5).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samicach, w wieku 6–8 miesięcy, ciężarze ciała około 150 g. Wśród zwierząt wyodrębniono grupę zwierząt kontrolnych, i doświadczalnych. Wszystkie zwierzęta karmiono ogólnie przyjętą dietą hodowlaną (owies, chleb

surowe jarzyny, woda). W grupie zwierząt doświadczalnych, w znieczuleniu ogólnym, eterowym metodą otwartą dokonywano operacyjnego podwiązania przewodu żółciowego. Przewód podwiązano jedwabną nitką, w jego części obwodowej, w odległości około 2–3 mm od ujścia do przewodu pokarmowego. Ranę operacyjną zeszywano warstwowo na glucho. W przebiegu pooperacyjnym u żadnego zwierzęcia powikłań nie spostrzegano. Operowane zwierzęta dekapitowano po 7, 14 i 21 dniach od dnia podwiązania przewodu. Zwierzęta przeznaczone do badania w dalszych terminach (do grupy 4) nie przeżyły planowanego okresu 42 dni, w związku z czym pozostawiono 3 grupy doświadczalne.

Wycinki obwodowej części prawego płata wątroby, pobierane od wszystkich zwierząt, utrwalano w 1% roztworze kwasu osmowego w buforze fosforanowym o pH 7,4 – przez okres 2 godzin. Następnie odwadniano w alkoholach etylowych o wzrastającym stężeniu i zatapiano w mieszaninie metakrylanów n-butyłu i metylu w temp. 48°C. Skrawki sporządzane na ultramikrotomie OmU (Reichert) oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Elmi D2 (Zeiss).

WYNIKI BADAŃ

Grupa kontrolna

Obraz makroskopowy: wątroba niezmieniona, barwy wiśniowo-brunatnej. Przewód żółciowy nitkowaty, o przekroju poniżej 1 mm.

(Ryc. 1) Komórki wątrobowe zwierząt kontrolnych wykazywały typową dla tego narządu ultrastrukturę. Granice komórek były wyraźnie widoczne, tworząca je otoczka komórkowa wpuklała się na krótkich odcinkach do wnętrza komórek, ograniczając w ten sposób kanaliki żółciowe (KŻ). Do światła kanalików wnikały cienkie, długie mikrokosmki. Wnętrze komórek wypełniały przekroje gładkiej siatki śródplazmatycznej (ER). Licznie reprezentowane były struktury ergastoplazmy (Er). Mitochondria (M) ułożone były w całej cytoplazmie pomiędzy jądrem a otoczką komórkową, były kształtu owalnego i podłużnego o gładkich obrysach i dobrze widocznej otoczce. Budowa wnętrza mitochondriów wykazywała liczne grzebienie, ułożone prostopadle do ich osi długiej, a macierz mitochondriów posiadała dużą gęstość elektronową. W obwodowych częściach cytoplazmy występowały nieliczne, drobne lizosomy (L) o gęstej strukturze. Jądra komórek (N) ułożone były w środkowej części komórek, posiadały dobrze zachowaną otoczkę i typową drobnoziarnistą budowę.

Grupa doświadczalna 1 (7 dni po podwiązaniu przewodu)

Obraz makroskopowy: wątroba powiększona, barwy żółtawo-brunatnej, o cechach zastoju. Przewód żółciowy o napiętych ścianach, przekroju 3,2 mm, przeświecający żółtawym zabarwieniem.

(Ryc. 2) Granice komórek wątrobowych były zachowane. W porównaniu z grupą kontrolną stwierdzało się znaczne poszerzenie kanalików żółciowych. Wnikające do ich światła mikrokosmki były krótsze. Przy dobrze zachowanych kanałach siatki śródplazmatycznej, których liczne przekroje wypełniały wnętrze komórki, zwracało uwagę znaczne zmniejszenie liczby struktur ergastoplazmy. Przekroje

kanałów siatki śródplazmatycznej były bardziej zagęszczone w porównaniu z grupą kontrolną. Liczba mitochondriów, ich wielkość oraz kształt i budowa wewnętrzna nie wykazywały uchwytnych różnic. W obrębie jąder komórkowych stwierdzono zmianę ich struktury wewnętrznej, polegającą na utworzeniu się plamistych przejaśnień wśród ziarnistego utkania. Struktura i wielkość lizosomów pozostały niezmienione, zwiększyła się natomiast ich liczba. W opisywanej grupie lizosomy spotykało się nie tylko na obwodzie komórki, ale również w pobliżu jądra.

Grupa doświadczalna 2 (14 dni po podwiązaniu przewodu)

Obraz makroskopowy: wątroba powiększona, zastoinowa, barwy brunatno-żółtej. szerokość napiętego i znacznie poszerzonego przewodu żółciowego wynosiła około 5 mm. Na przestrzeni od wnęki wątroby do podwiązki przewód tworzył workowatą torbiel o ścięcających ścianach, barwy żółto-zielonej.

(Ryc. 3) Granice komórek pozostały niezmienione. Kanaliki żółciowe szerokie, przyjmowały kształt owalny. Trudno określić granice mikrokosmków na ścianach kanalików. Ich światło wypełniały struktury mogące przypominać mikrokosmki. Przekroje kanałów gładkiej siatki śródplazmatycznej w porównaniu z grupą doświadczalną 1 wykazywały nieco luźniejsze ułożenie. Siatka śródplazmatyczna była jednak gęstsza niż w komórkach grupy kontrolnej. Struktur ergastoplazmatycznych nie obserwowano. Mitochondria tylko w niewielkiej liczbie pozostały niezmienione. W większości wykazywały nierówne obrysy i zaburzenia wewnętrznej budowy, polegające na zatarciu rysunku grzebieni mitochondrialnych i pojawieniu się przejaśnień w ich macierzy. Liczba, obraz i rozmieszczenie lizosomów były podobne jak w grupie doświadczalnej 1. Jądra komórek wątrobowych wykazywały pofałdowanie obrysów oraz skupienia chromatyny, umiejscowione głównie przy wewnętrznej stronie otoczki.

Grupa doświadczalna 3 (21 dni po podwiązaniu przewodu)

Obraz makroskopowy: wygląd i zabarwienie wątroby podobne do grupy poprzedniej. Od wnęki wątroby rozciągała się torbiel przewodu żółciowego, wielkości ziarna pieprzu, przeświecająca zabarwieniem żółto-zielonym.

(Ryc. 4) Granice pomiędzy niektórymi komórkami były zatarte, w innych miejscach dobrze zachowane. Obraz kanalików żółciowych był podobny do opisanego w grupie doświadczalnej 2, przy niemal całkowitym zaniku mikrokosmków. Kanały gładkiej siatki śródplazmatycznej w większości były poprzerywane, a w cytoplazmie komórek obserwowano miejsca opustoszenia. Ergastoplazmy brak, podobnie jak w poprzedniej grupie. Duże zmiany obserwowano w obrębie mitochondriów. Wszystkie te organella komórkowe były spęczniałe, a to prowadziło do zupełnego zaburzenia struktury wewnętrznej, zniszczenia grzebieni i braku ciemnej macierzy. Obraz mitochondriów może przemawiać za ich wakuolizacją. Nieliczne mitochondria miały również przerwana otoczkę zewnętrzną. Lizosomy nie wykazywały różnic

w rozmieszczeniu, liczbie i wyglądzie w porównaniu z grupami doświadczalnymi poprzednio opisanymi. Jądra komórkowe były podobne do opisanych w grupie doświadczalnej 2, z obecnością większych powierzchni przejaśnień w ich utkaniu wewnętrznym.

OMÓWIENIE

W naszych badaniach uwzględniliśmy najważniejsze, uchwytnie zmiany podstawowych części składowych komórki wątroby. Na pierwszy plan wybijało się najwcześniej występujące, znaczne i postępujące w miarę upływu czasu poszerzenie kanalików żółciowych, powstałe na skutek przepełnienia ich nagromadzoną żółcią. Nadciśnienie żółci powodowało spłaszczenie i skrócenie, a następnie zupełne zatarcie budowy mikrokosmków.

Wydzielanie żółci do włośniczek żółciowych z komórki następuje drogą bezpośredniego przenoszenia się jej cząsteczek przez błonę komórkową do światła włośniczek. Dla określenia tego procesu wprowadzono nazwę „transmembranosis” (3). Liczne, rozbudowane mikrokosmki powiększają powierzchnię wydzielniczą prawidłowej komórki wątroby i ułatwiają wydzielanie żółci. Przedłużający się zastój żółci i nadciśnienie we włośniczkach żółciowych, przy jednoczesnym zmniejszeniu powierzchni wydzielania błony komórkowej poprzez całkowite uciśnięcie, a nawet zniszczenie mikrokosmków, doprowadza do ustania albo zmiany kierunku wydzielania żółci. W obrazie mikroskopu elektronowego można to zaobserwować, stwierdzając zmianę położenia lizosomów, które w przebiegu żółtaczk mechanicznej układały się po stronie naczynia zatokowego komórki, co jest dowodem zmiany kierunku wydzielania żółci. Lizosomy są głównymi przenośnikami żółci, zawierają bilirubinę, a jednocześnie pełnią rolę wewnątrzkomórkowych przenośników enzymatycznych (3, 6, 7). Obserwuje się wzrost ilości lizosomów okołokanalikowych w miarę nasilania się zastoju żółci (6). Z połączenia wielu lizosomów może powstać kropelka żółci (7). Po podwiązaniu przewodu żółciowego pojawiają się odgałęzienia kanalików żółciowych, biegnące między komórkami do przestrzeni pod naczyniami zatokowymi (1). Można więc przyjąć, że dochodzi do bezpośrednich połączeń między kanalikami żółciowymi, a naczyniami zatokowymi, tzw. przestrzeniami Dissego, czyli do połączenia między krwią i żółcią (7). W naszym materiale obserwowaliśmy istotne zmiany w szerokości światła kanalików żółciowych, w kształcie mikrokosmków kanalikowych oraz w zwiększeniu liczby lizosomów.

Drugą, dobrze widoczną cechą komórki wątroby było zmniejszenie się ilości ergastoplazmy już w grupie doświadczalnej 1, a wreszcie jej całkowity brak w grupach następnych. Jednocześnie widoczne były cechy zagęszczenia gładkiej siatki śródplazmatycznej, co dowodzi jej ilościowego wzrostu. Zjawisko to obserwowali w żółtaczkach doświadczalnych również i inni autorzy (6). Opisane powyżej zmiany były związane ze stopniowym wyczerpywaniem się zapasów glikogenu i zmniejszeniem zasadochłonności komórki. W obrazie mikroskopu elektronowego stwierdzało się

zmniejszenie ilości szorstkiej siatki śródplazmatycznej (ergastoplazmy) oraz ogniskowy ubytek ziaren Palada (kwasu rybonukleinowego) z jej powierzchni. W części worków gładkiej siatki śródplazmatycznej stwierdzało się zagęszczenia, co było związane ze względną wyższą kwasochłonnością protein, przy równoczesnym zużyciu zasadochłonnych rybonuklein (6). Siatka śródplazmatyczna jest przenośnikiem niektórych składników tworzących żółć i odgrywa rolę w jej syntezie (3). W naszym materiale powyższe zmiany występowały wyraźnie, aż do całkowitego zaniku szorstkiej siatki śródplazmatycznej oraz wystąpienia (w grupie doświadczalnej 3) rozległych pól całkowitego opustoszenia, co świadczy o bardzo znacznym wyczerpaniu komórki wątroby i zachwianiu jej podstawowych czynności.

Trzecią pogłębiającą się, a zaobserwowaną w naszych doświadczeniach zmianą były przeobrażenia w obrębie mitochondriów. Począwszy od grupy doświadczalnej 2, były widoczne zmiany w regularności ich kształtów, zatarcie rysunku i z kolei zniszczenie grzebieni mitochondrialnych oraz pojawienie się przejaśnień w ich macierzy, spęcznienie i wytworzenie się wodniczek wewnątrz mitochondriów.

Mitochondria biorą udział w metabolizmie żółci, lecz do dziś rola ich nie jest dokładnie poznana (3). Obserwowano w przebiegu żółtaczek mechanicznych zmiany w liczbie mitochondriów (3), jak również znaczne zmiany w ich budowie (7). Opisano, że występuje wzrost wielkości mitochondriów przy zwiększonym wydzielaniu żółci oraz zmniejszenie się ich gęstości elektronowej (3). Stwierdzone w naszych doświadczeniach zmiany mitochondriów świadczyły o daleko idącym uszkodzeniu, a stopień uszkodzenia zależał od czasu, w jakim powstała przeszkoda w odpływie żółci.

Podobnie nasilające się w miarę upływu czasu cechy uszkodzenia, wykazywały zmiany budowy jądra komórki wątroby. W miejsce typowego, ziarnistego utkania, obserwowano w obrębie plazmy jądra ogniska przejaśnienia, a następnie wyraźne skupienia elektronowo gęstych ziaren chromatyny, gromadzących się głównie wokół wewnętrznej strony otoczki jądra. Rzucano się w oczy wyraźne zniekształcenie gładkich zazwyczaj obrysów otoczki jądra, znaczne jej pofałdowanie, będące wyrazem zachwiania równowagi w ilościowym i jakościowym rozmieszczeniu składników plazmy zarówno jądra, jak i całej komórki.

Wszystkie opisane w naszych doświadczeniach zmiany są zmianami wstecznymi. Istnieje możliwość powrotu budowy poszczególnych składników komórki wątroby do stanu prawidłowego, o ile odpowiednio wcześniej zostanie przywrócona drożność układu żółciowego. Przy długo utrzymującym się zastoju żółci, w wyniku rozerwania się i pęknięcia lizosomów, dochodzi do rozlania się wewnątrz komórki nagromadzonych w lizosomach licznych enzymów (około 30), co powoduje samostrawienie komórki (7). Fakan i wsp. sądzą, że w powstałych w ten sposób wolnych przestrzeniach w obrębie mięszu wątroby, odbywa się narastanie nowotworzących się komórek. Odnowa wątroby rozpoczyna się już w czasie utrzymywania się przeszkody w odpływie żółci (4) i trwa nadal po usunięciu przyczyny żółtaczki mechanicznej.

Ze względu na nieprzeżycie przez zwierzęta ostatniej grupy doświadczalnej okresu powyżej 3 tygodni, końcowych zmian i rozpadu komórki w naszych doświadczeniach nie zdołaliśmy uchwycić.

PIŚMIENICTWO

1. Bloom W., Fowcett D. W.: *Histologia*, PZWL, Warszawa 1967.
2. Dickson E. R., Fletcher J.: *Mayo Clin. Proceed.* **40**, 288—295, 1965.
3. Dvorak M., Horky D.: *Zschr. f. Zellforsch.* **76**, 48—497, 1967.
4. Fakan F., Kropackova L., Sirlava A., Margot T.: *Naturwissenschaften*, **53**, 555—556, 1966.
5. Toker C., Trevino N.: *Arch. Path. (Chicago)*, **8**, 453, 1965.
6. Steiner J. W., Carruther J. S., Kalifat S. R.: *Zschr. f. Zellforsch.* **58**, 141—159, 1962.
7. Wysocki J.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 1031—1033, 1965.

Otrzymano 21.IV.1971

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Komórka wątroby szczura. KŻ — kanalik żółciowy, N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, ER — siateczka endoplazmatyczna, Er — ergastoplazma.

Ryc. 2. Grupa doświadczalna 1. Komórka wątroby szczura. KŻ — kanalik żółciowy, N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, ER — siateczka śródplazmatyczna, Er — ergastoplazma.

Ryc. 3. Grupa doświadczalna 2. Komórka wątroby szczura. KŻ — kanalik żółciowy, N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, ER — siateczka śródplazmatyczna.

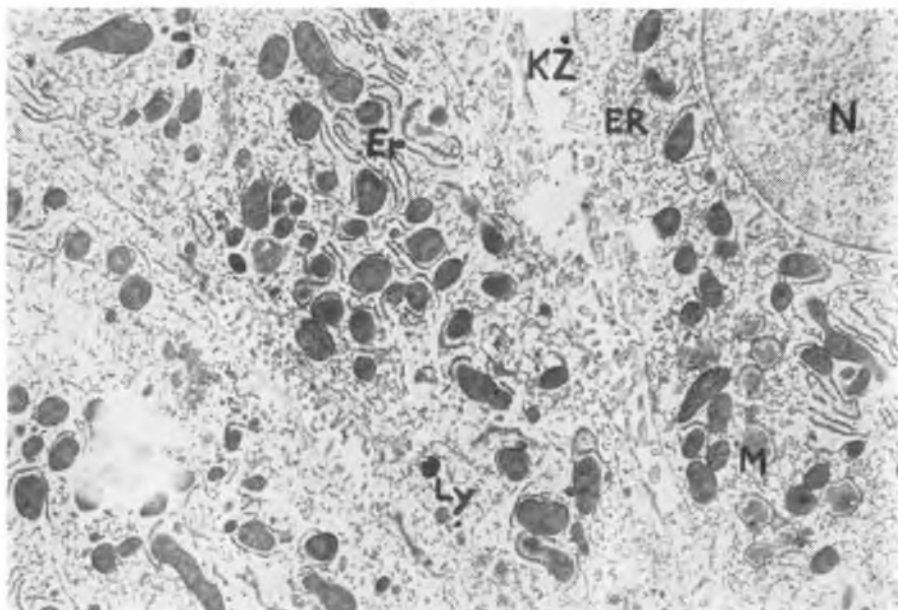
Ryc. 4. Grupa doświadczalna 3. Komórka wątroby szczura. KŻ — kanalik żółciowy, N — jądro, M — mitochondria, Ly — lizosomy, ER — siateczka śródplazmatyczna.

РЕЗЮМЕ

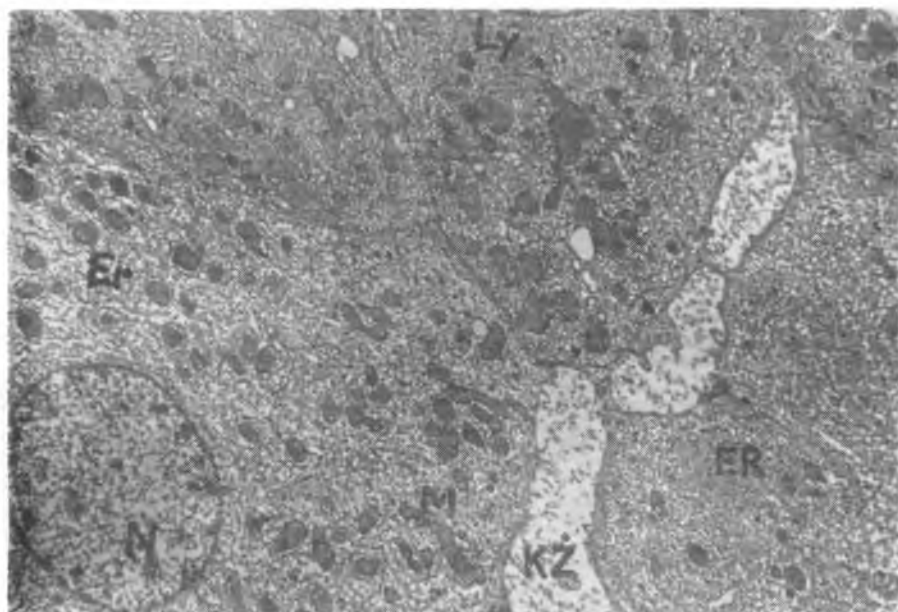
Автор исследовал изменения ультраструктуры печеночных клеток белых крыс, у которых была проведена предварительная лигатура желчных путей. Накладывание лигатуры проведено операционным вмешательством. Изменения ультраструктуры печеночных клеток наблюдали на 7, 14, 21 день после наложения лигатуры. Обнаружены явные изменения: расширение желчных канальцев, сплюснутость микроворсинок, увеличение лизосомов, постепенная атрофия шероховатой сетки эргоплазма, а также изменения формы, величины и электронной плотности митохондрий.

SUMMARY

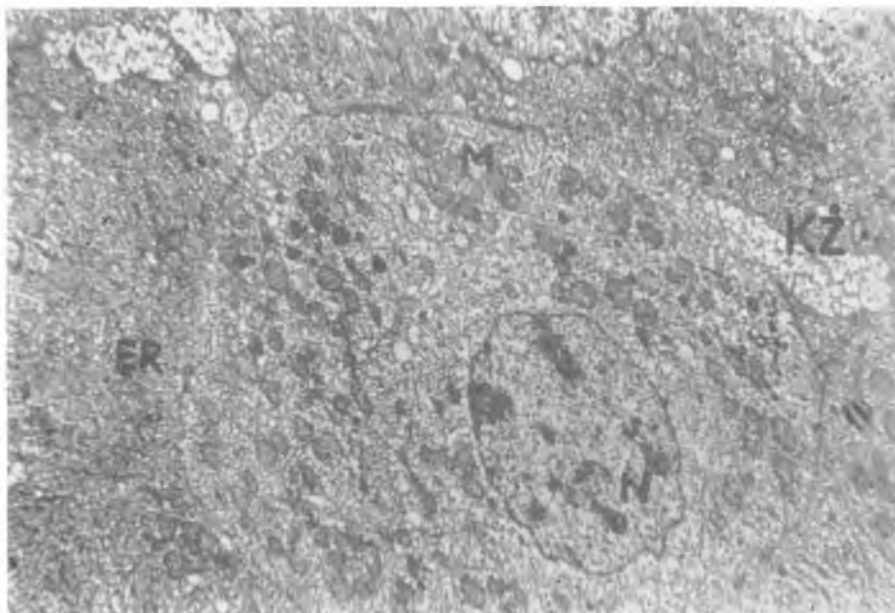
Ultrastructural changes in the hepatic cells of white rats were examined. The author performed operative ligation of the bile duct in the rats and observed alterations in the ultrastructure of the hepatic cells on the 7th, 14th, and 21st day after the ligation. The following significant changes in the cells were observed: the dilation



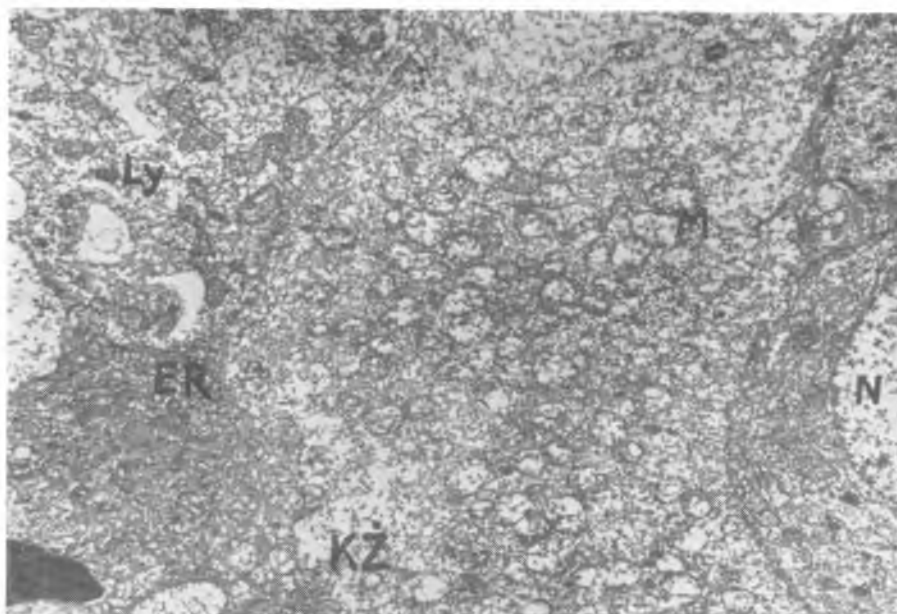
Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



Ryc. 4

of bile canaliculi, flattening of microvilli, increase in the number of lysosomes, progressive atrophy of granular endoplasmic reticulum and alterations in the form size and electronic density of the mitochondria.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Control group. A hepatic cell of the rat. KŻ — bile canaliculus, N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, ER — endoplasmic reticulum, Er — granular endoplasmic reticulum.

Fig. 2. Experimental group 1. A hepatic cell of the rat. KŻ — bile canaliculus, N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, ER — endoplasmic reticulum, Er — granular endoplasmic reticulum.

Fig. 3. Experimental group 2. A hepatic cell of the rat. KŻ — bile canaliculus, N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, ER — endoplasmic reticulum.

Fig. 4. Experimental group 3. A hepatic cell of the rat. KŻ — bile canaliculus, N — nucleus, M — mitochondria, Ly — lysosomes, ER — endoplasmic reticulum.

