ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXIX, 44 SECTIO D 1984

Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Fluorescencyjnej. Zakład Anatomii Patologicznej. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik Pracowni: prof. dr hab. Daniel Chibowski
Klinika Gastroenterologii. Instytut Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Jan Pokora

Daniel CHIBOWSKI, Zofia SIEZIENIEWSKA,
Janusz CZARNECKI, Jan POKORA,
Anna CHODKOWSKA

# Wpływ fenobarbitalu na obraz morfologiczny, histochemiczny i ultrastrukturalny wątroby szczura po przewlekłym podawaniu $CCl_4$

Влияние фенобарбитала на морфологическую, гистохимическую и ультраструктурную картину печени крыс после хронического введения $CCl_4$

The Effect of Phenobarbital on Morphological, Histochemical and Ultrastructural Picture of Rat's Liver after Chronic Administration of $CCl_4$

Przewlekłe podawanie $CCl_4$ wywołuje zmiany uszkadzające, regeneracyjne i reparacyjne w wątrobie, prowadzące do marskości (5, 11). Jednocześnie obserwuje się postępujące upośledzenie funkcji wątroby, a także jej zdolności detoksykacyjnych i biotransformacyjnych w odniesieniu zarówno do metabolitów ustrojowych, jak i stosowanych leków. Wykazano (6, 20), że zastosowanie fenobarbitalu przed podaniem $CCl_4$ przyspiesza rozwój zmian w wątrobie i zwiększa ich stopień nasilenia. Jest to prawdopodobnie wynikiem indukcji mikrosomalnego systemu transportu elektronów (MFO) przez fenobarbital, przyspieszającego rozpad $CCl_4$ do jego toksycznych metabolitów o charakterze wolnych rodników (1, 2, 6, 13, 17, 19, 20).

Proces biotransformacji leków i innych związków egzo- i endogennych odbywa się głównie w gładkiej sieci endoplazmatycznej hepatocytów przy współudziale MFO. Wydolność metaboliczna systemu MFO może w istotny sposób warunkować efekt działania wielu leków metabolizowanych w wątrobie przez przyspieszenie lub zwolnienie ich biotransformacji. Ponadto szereg leków lub ich metabolitów poprzez interakcję na poziomie metabolicznym może przedłużyć albo skrócić własne działanie lub działanie innych leków (3).

Biorąc pod uwagę fakt, że przewlekłe uszkodzenie wątroby $CCl_4$ prowadzi do zmiennej funkcji biotransformacyjnej narządu, postanowiono ocenić efekty stymulacji systeemu MFO w tak zmienionej wątrobie i porównać je z możliwościami indukcji tego systemu w wątrobie szczurów zdrowych. W tym celu zastosowano feno-

barbital jako znany induktor systemu MFO (3). Ocenę stopnia indukcji tego systemu prowadzono w oparciu o histochemiczne określanie aktywności glikozo-6-fosfatazy w tkance wątrobowej oraz ultrastrukturalną ocenę zawartości gładkiej sieci endoplazmatycznej (SER) w hepatocytach. Poliferacja SER stanowi bowiem bezpośredni wykładnik indukcji systemu MFO (3, 4, 9, 10, 12, 20).

## MATERIAŁ I METODY

Do badania użyto 40 szczurów samców szczepu Wistar w wieku 5—7 mies. i c.c. 250—270 g. Grupę kontrolną stanowiło 10 szczurów, które otrzymywały dootrzewnowo 0,9% roztwór NaCl w objętości, którą stosowano do rozpuszczenia fenobarbitalu. W grupie I doświadczalnej 10 szczurom podawano fenobarbital rozpuszczony w 0,9% roztworze NaCl w dawce 5 mg/kg/dobę przez 7 kolejnych dni. W grupie II doświadczalnej, liczącej 10 szczurów, przewlekłe uszkodzenie wątroby wywoływano dootrzewnowym podawaniem 0,1 ml $CCl_4$ co 7 dni przez 12 tygodni. W grupie III doświadczalnej (10 szczurów) po 12 tygodniach stosowania $CCl_4$ podawano dootrzewnowo fenobarbital rozpuszczony w 0,9% roztworze NaCl w dawce 5 mg/kg/ /dobę przez 7 kolejnych dni. Po 8 dniach od ukończenia podawania fenobarbitalu, $CCl_4$ lub roztworu NaCl, zwierzęta usypiano doodbytniczym podaniem 2% roztworu wodzianu chloralu w ilości 1,8 ml/100 g wagi ciała zwierzęcia i uśmiercano przez dekapitację.

Wycinki wątroby utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i zatapiano w parafinie. Preparaty parafinowe barwiono metodą H+E. Nie utrwalone wycinki wątroby, przeznaczone do badań histochemicznych, zamrażano w eterze naftowym ochłodzonym mieszaniną aceton—suchy lód do temp. —76°C i bezpośrednio krojono w kriostacie Polar KM-11 w temp. ok. —14°C. Odczyn na glikozo-6-fosfatazę wykonywano według Wachsteina i Meisel, stosując jako substrat sól dwusodową glikozo-6-fosforanu (Sigma USA) w buforze Tris—kwas maleinowy o *pH* 6,7. Czas inkubacji wynosił 25 min. Wycinki wątroby, pobrane do badań ultrastrukturalnych, utrwalano w 4% aldehydzie glutarowym w 0,1 M buforze kakodylowym (*pH* 7,2—7,4), a następnie 1% czterotlenku osmu w buforze Michaelisa (*pH* 7,2—7,4), odwadniano w etanolu, przeprowadzano przez tlenek propylenu i zatapiano w Eponie 812. Bloczki eponowe krojono na ultramikrotomie Tesla BS-490A. Z preparatów półcienkich, zabarwionych błękitem toluidyny, wybierano miejsca do krojenia skrawków utracienkich, które krojono ze wszystkich stref zrazika wątrobowego. Preparaty ultracienkie dobarwiano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i płynem Reynoldsa. Preparaty ultracienkie oglądano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500.

## WYNIKI

W preparatach parafinowych zwierząt grupy I doświadczalnej nie wykazano odchyleń od normy. W grupach doświadczalnych II i III wykazano stłuszczenie licznych hepatocytów (ryc. 1a), cechy martwicy skrzepowej oraz rozpływnej nielicznych, bezładnie rozproszonych hepatocytów. W dość licznych hepatocytach wykazano hiperchromazję i powiększenie jąder, co może być wykładnikiem regeneracji (ryc. 1a). Ponadto

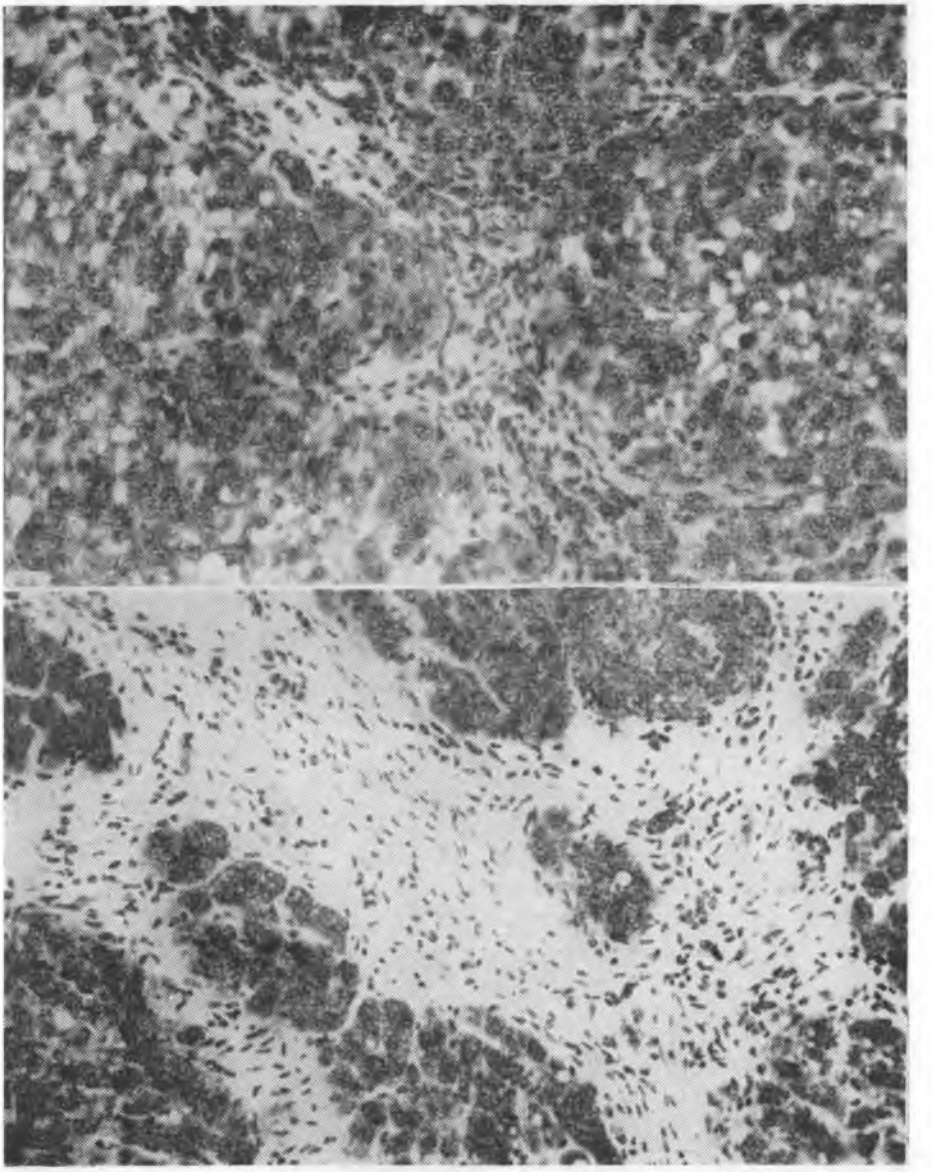
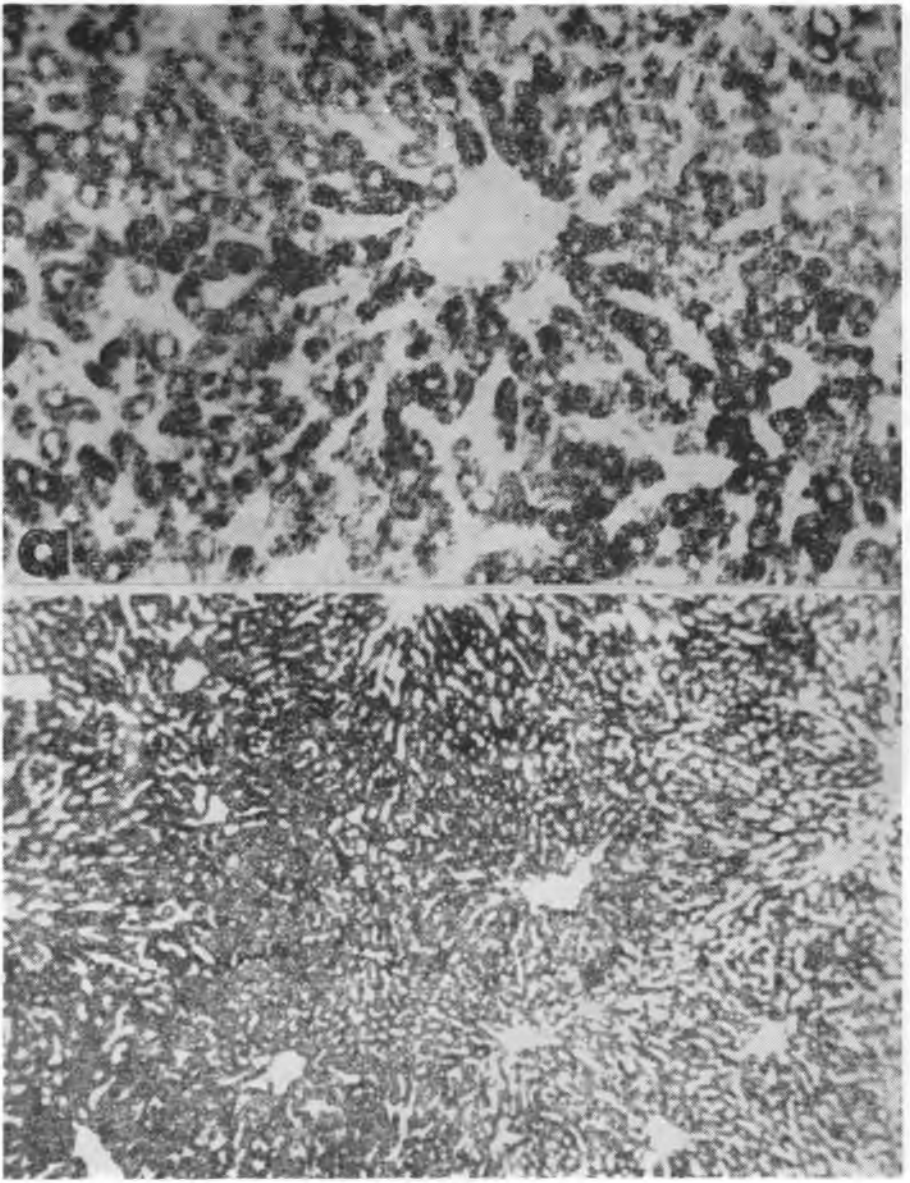
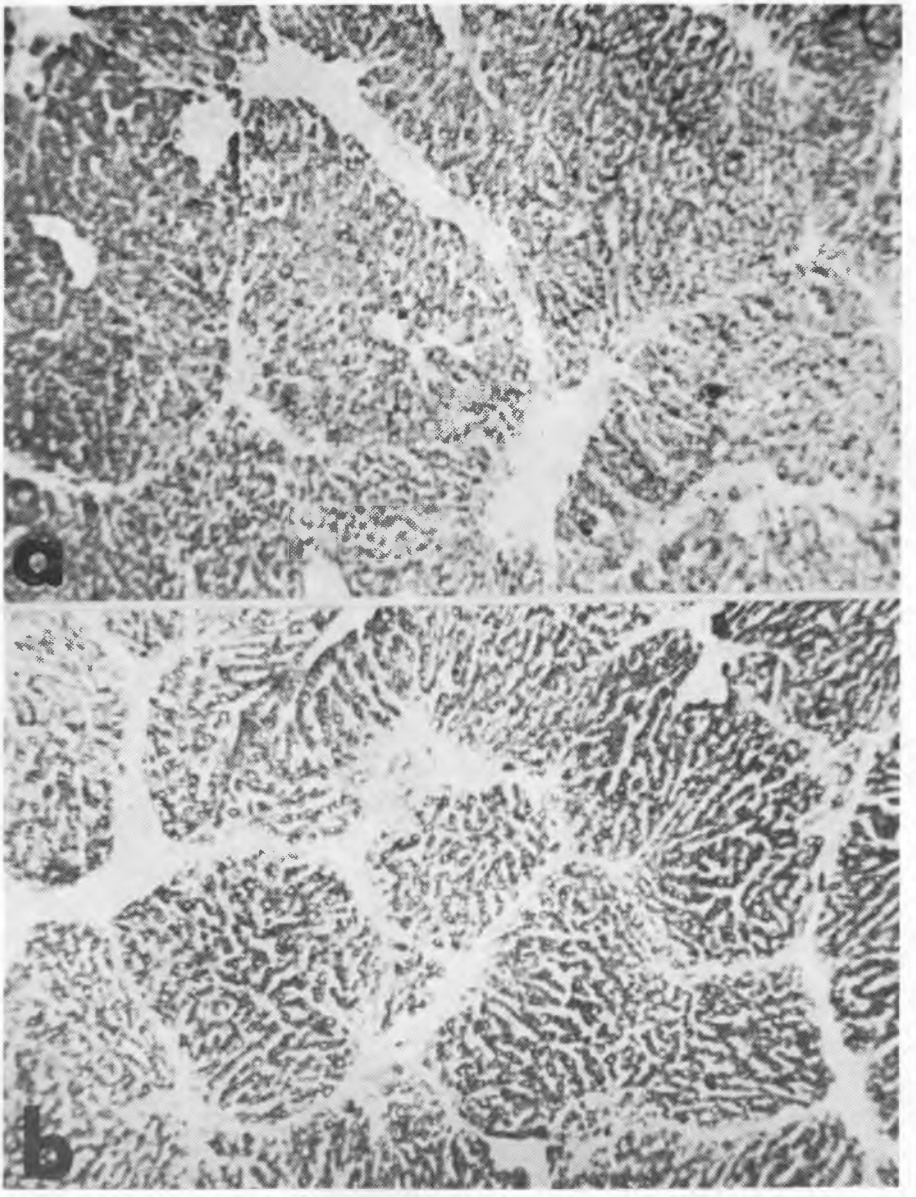


Рис. 1

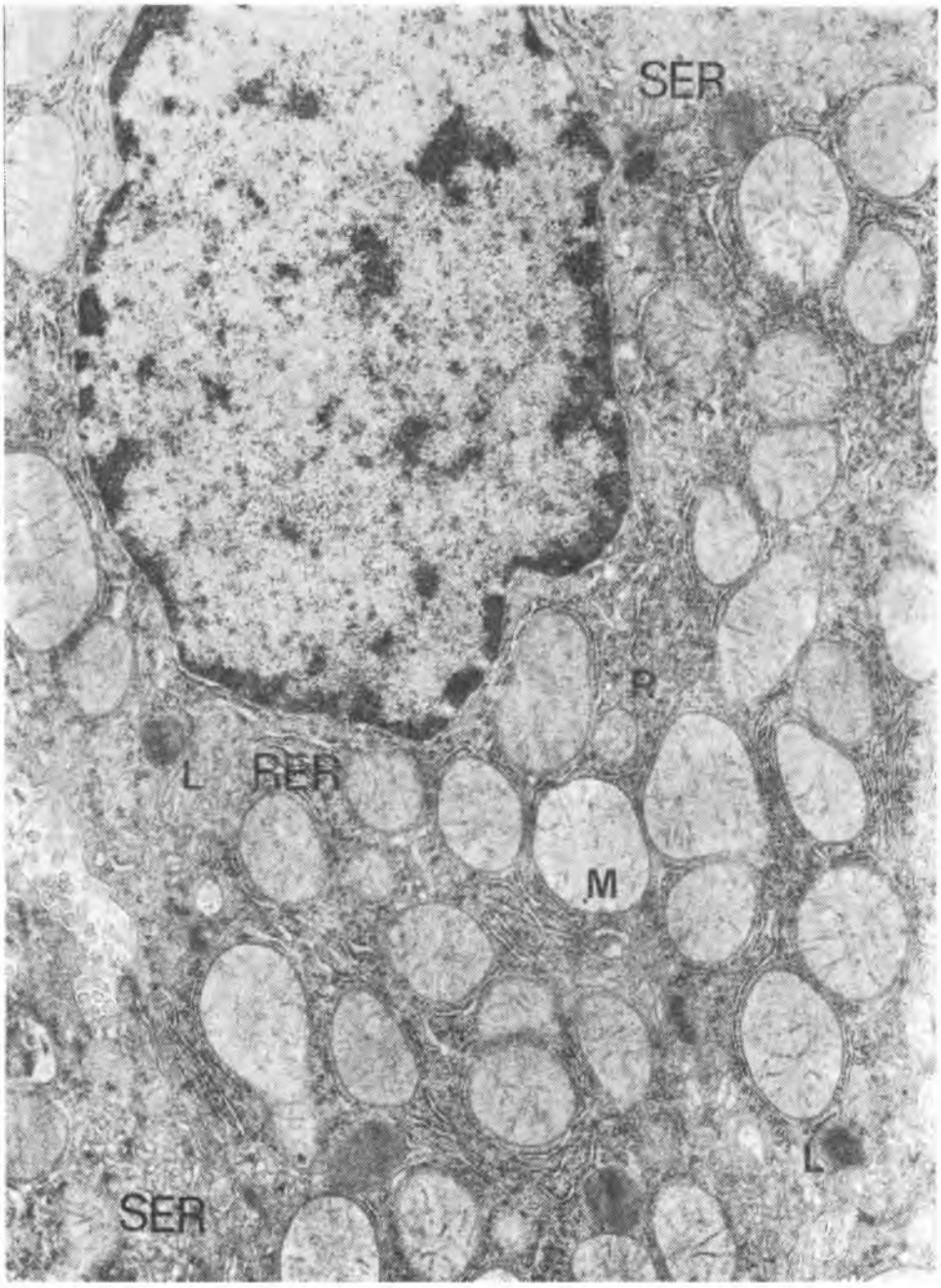
D. Chibowski, Z. Siezieniewska, J. Czarnecki, J. Pokora, A. Chodkowska



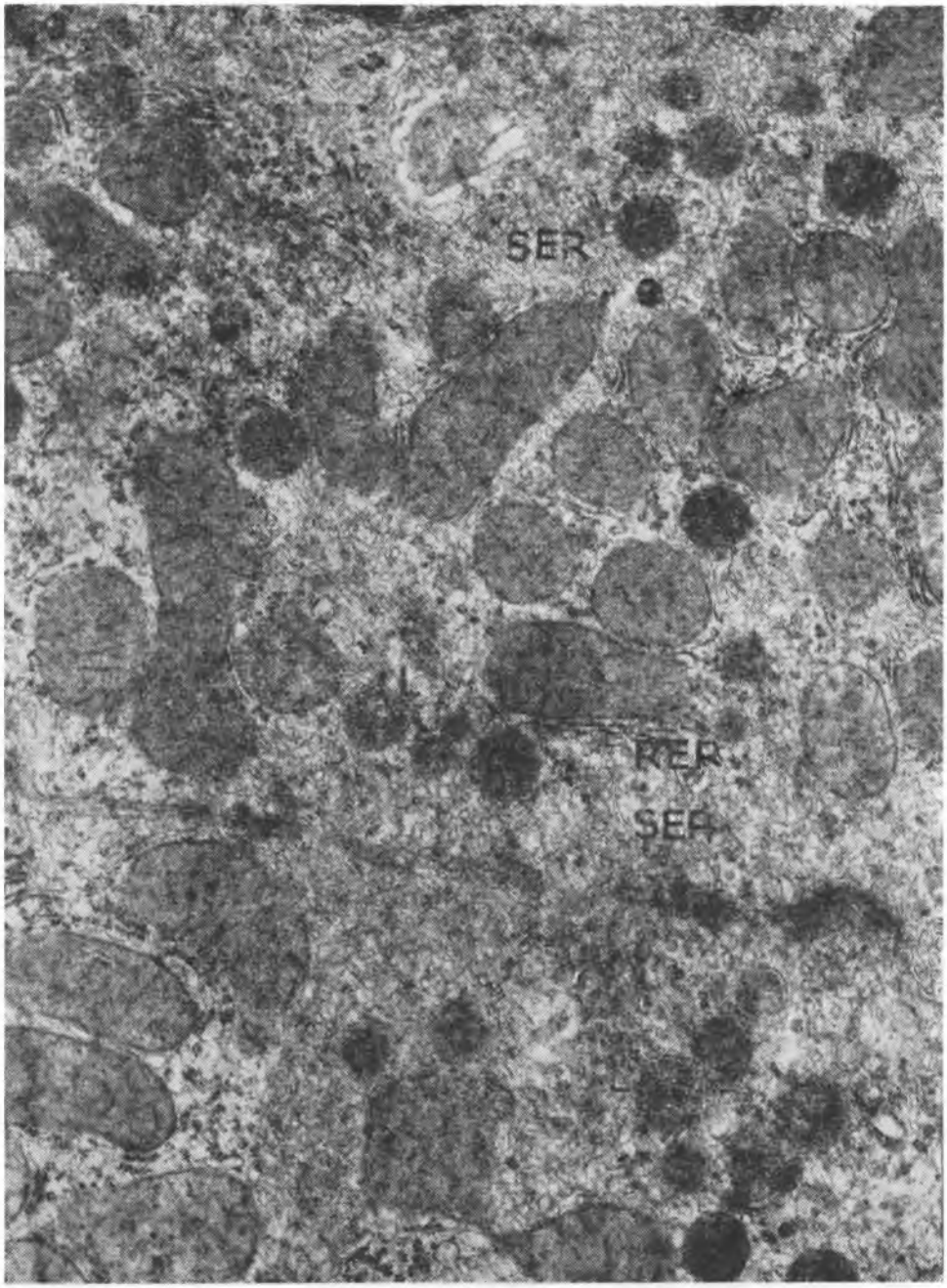

Ryc. 2




Ryc. 3

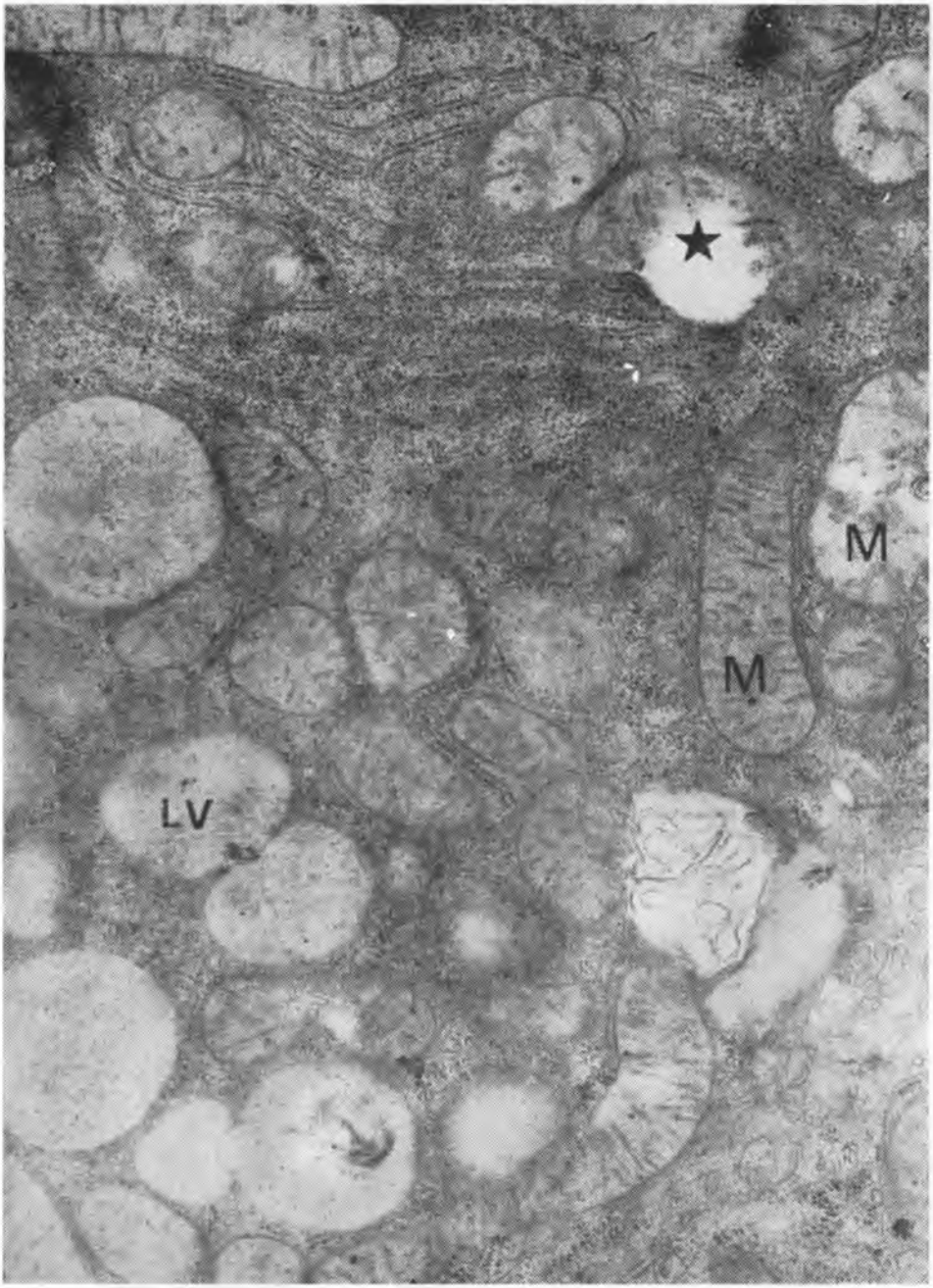



Ryc. 4



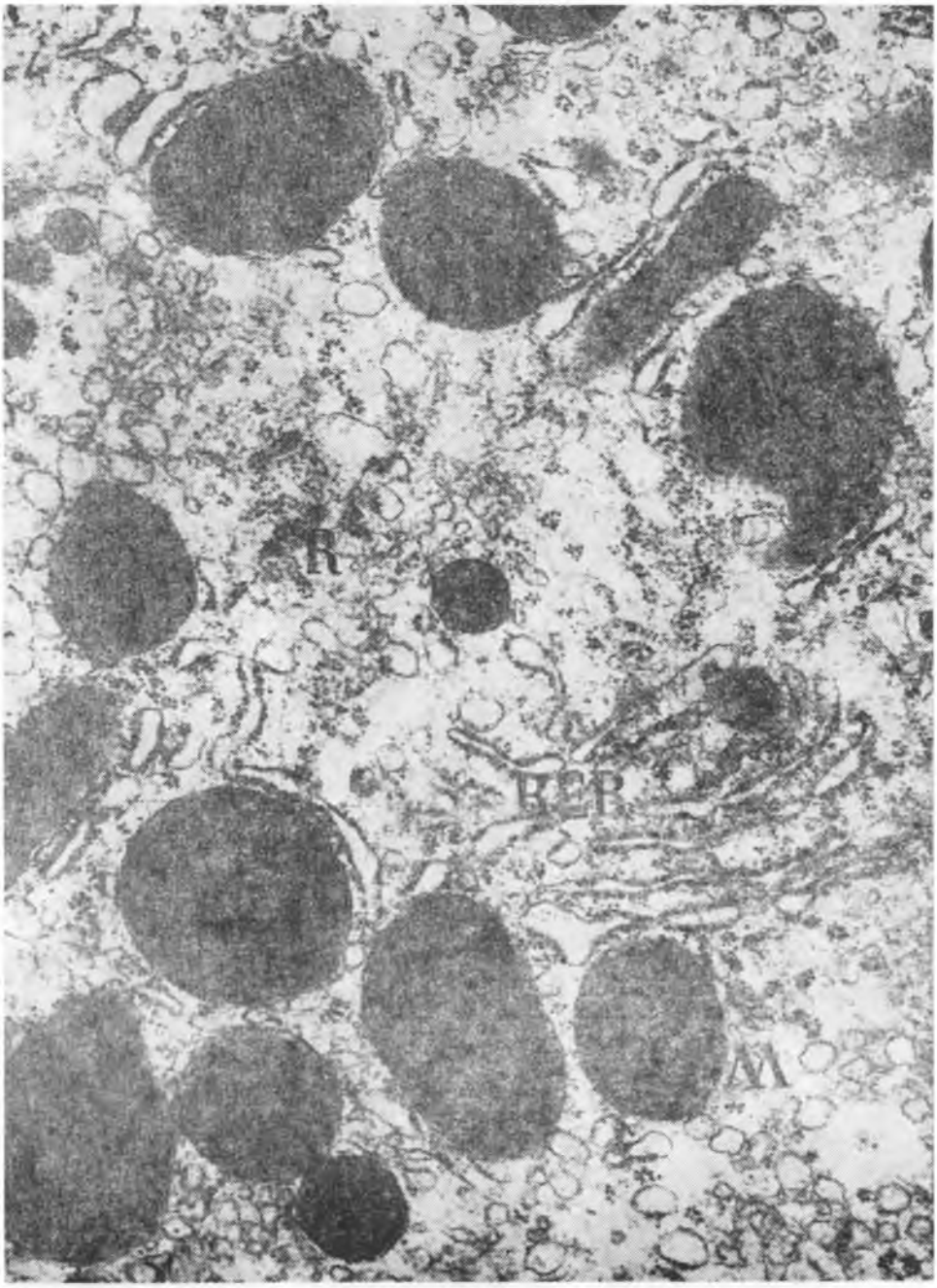

Ryc. 5

D. Chibowski, Z. Siezieniewska, J. Czarnecki, J. Pokora, A. Chodkowska



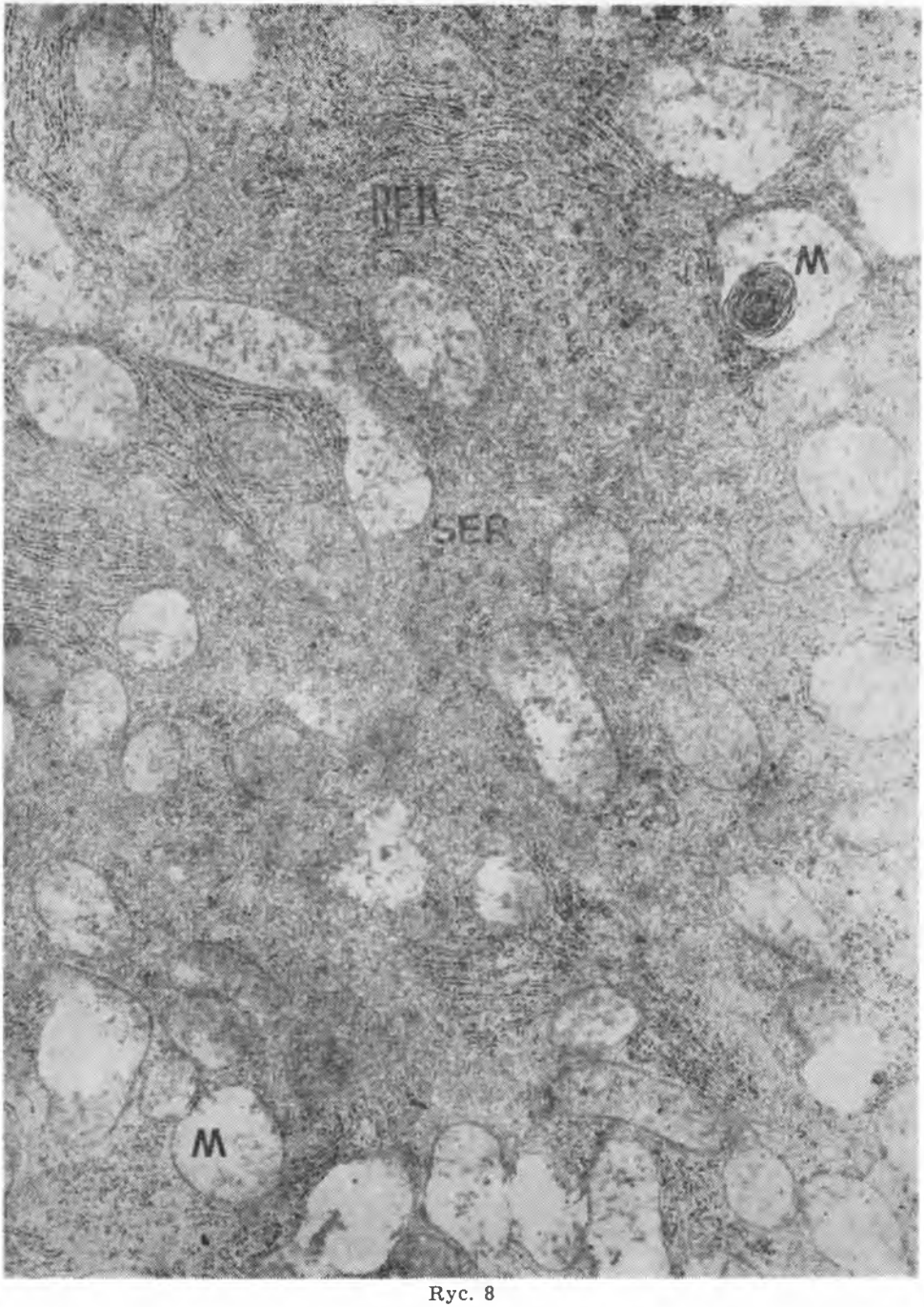

Ryc. 6

D. Chibowski, Z. Siezieniewska, J. Czarnecki, J. Pokora, A. Chodkowska

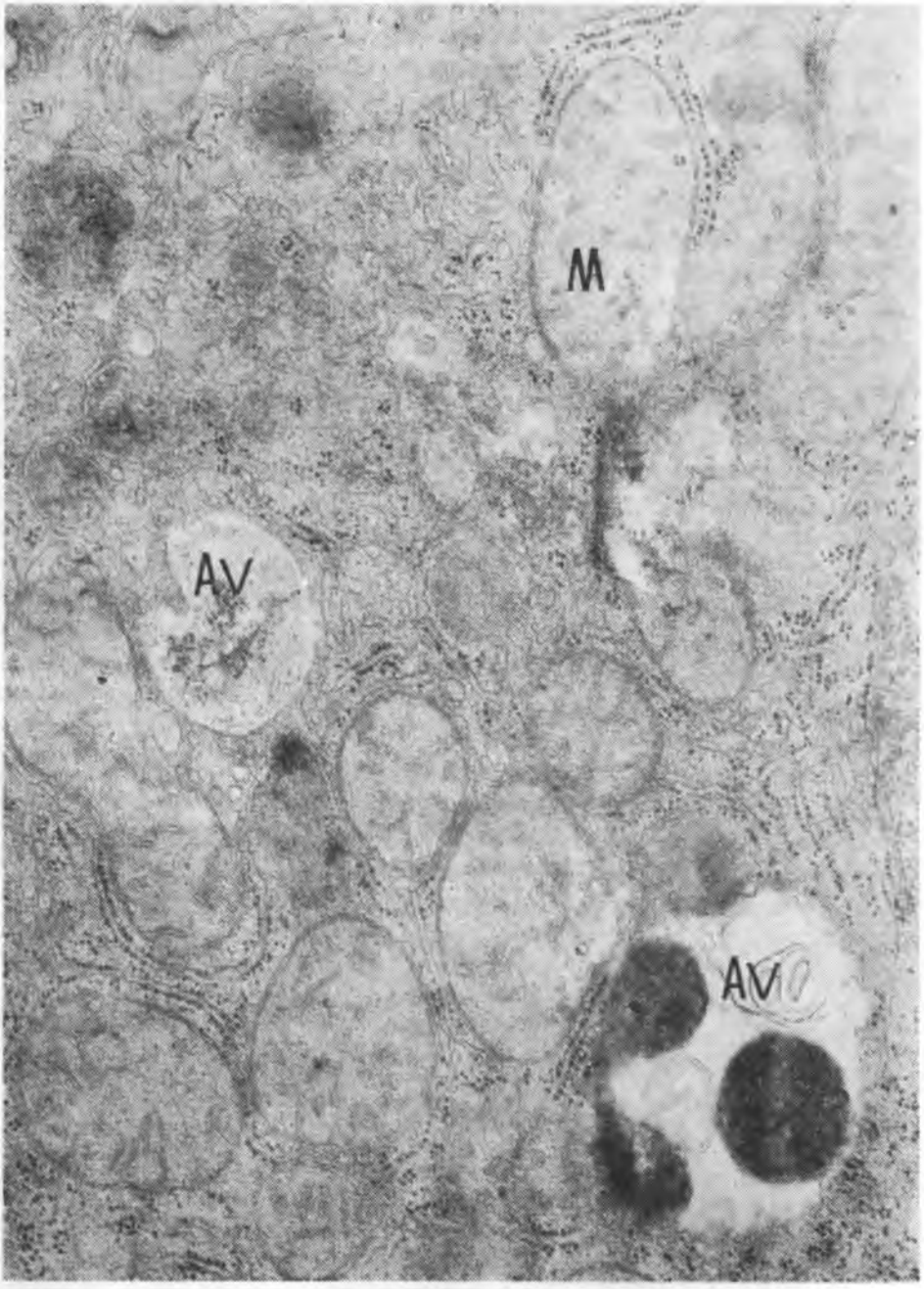



Ryc. 7

D. Chibowski, Z. Siezieniewska, J. Czarnecki, J. Pokora, A. Chodkowska




Ryc. 8




Ryc. 9

D. Chibowski, Z. Siezieniewska, J. Czarnecki, J. Pokora, A. Chodkowska

obserwowano zapadnięcia zrębu tworzące przegrody bierne (ryc. 1a). Niektóre z nich znajdowały się w fazie włóknienia, przekształcając się w przegrody czynne (ryc. 1a). Obserwowano także zatarcie budowy zrazikowej i formowanie się guzków regeneracyjnych, zwykle nie posiadających żyły centralnej (ryc. 1b). Obrazy wątroby szczurów w obu tych grupach doświadczalnych nie różniły się od siebie.

Aktywność glikozo-6-fosfatazy stwierdzano w cytoplazmie hepatocytów, jądra komórkowe nie wykazywały pozytywnej reakcji. Intensywność odczynu u zwierząt kontrolnych była większa w strefie centralnej niż w pozostałych strefach zrazika (ryc. 2a). Po zastosowaniu fenobarbitalu (grupa I doświadczalna) obserwowano wzmożenie intensywności odczynu na glikozo-6-fosfatazę na terenie całego zrazika. Nie wykazywano różnic w intensywności odczynu w poszczególnych strefach zrazika (ryc. 2b). W grupie II doświadczalnej wykazywano mierną intensywność odczynu na glikozo-6-fosfatazę i ogniskowy brak odczynu w hepatocytach zlokalizowanych na obrzeżach guzków regeneracyjnych (ryc. 3a) lub bezładnie w nich rozproszonych. Nie wykazywano pozytywnego odczynu histochemicznego w obrębie przegród czynnych i biernych. W grupie III doświadczalnej intensywność odczynu na glikozo-6-fosfatazę była większa w porównaniu z grupą II doświadczalną (ryc. 3b). W niektórych hepatocytach stwierdzano intensywny odczyn gruboziarnisty, w innych zaś, zlokalizowanych zwykle na obrzeżach guzków regeneracyjnych, obserwowano słaby drobnoziarnisty odczyn lub brak odczynu.

Obraz ultrastrukturalny hepatocytów w grupie kontrolnej odpowiadał opisom normy (ryc. 4). W okolicy okołojądrowej występowały skupienia szorstkiej sieci endoplazmatycznej (RER), której kanały tworzyły także otoczkę jądrową. Poza strefą przyjądrową kanały RER lokalizowały się zwykle w sąsiedztwie mitochondriów. Rybosomy były związane z błonami sieci endoplazmatycznej, rzadziej leżały luźno w hialoplazmie pojedynczo lub tworzyły polisomy. Gładka sieć endoplazmatyczna (SER) skupiała się najobficiej w biegunie żółciowym lub naczyniowym hepatocytu. Wokół kanałów SER obserwowano często skupienia α- i β-glikogenu. Różnokształtne mitochondria posiadały wyraźne błony obrzeżające oraz grzebienie. Macierz mitochondrialna wykazywała mierną gęstość elektronową. Lizosomy i peroksysomy były nieliczne i lokalizowały się najczęściej w okolicy bieguna żółciowego hepatocytu. Nie obserwowano natomiast lizosomów wtórnych. Hepatocyty w swych biegunach żółciowych łączyły się za pomocą połączeń ścisłych i desmosomów. Do światła kanalików żółciowych wpuklały się liczne mikrokosmki. Przestrzeń Dissego zawierała liczne typowe mikrokosmki, a czasem nieliczne, regularnie ułożone pęczki włókien kolagenowych.

W grupie I doświadczalnej obserwowano wyraźną proliferację SER

w wielu hepatocytach, zlokalizowanych we wszystkich strefach zrazika (ryc. 5). Pęcherzyki i kanały SER nie były poszerzone i zajmowały znaczne obszary cytoplazmy. Jednocześnie stwierdzano zmniejszenie ilości RER oraz zawartości glikogenu w cytoplazmie w porównaniu z grupą kontrolną. Wzrastała także liczba lizosomów pierwotnych i peroksysomów (ryc. 5). Lokalizowały się one w różnych obszarach cytoplazmy, nie tylko w biegunie żółciowym. Obserwowano ponadto dość liczne wakuole autofagocytarne, zawierające w swym obrębie glikogen oraz kanały SER. W nielicznych hepatocytach wykazywano pojedyncze, drobne wakuole tłuszczowe oraz figury mielinowe w hialoplazmie.

W grupie II doświadczalnej stwierdzano przerwanie ciągłości błony komórkowej hepatocytów od strony przestrzeni Dissego i uwalnianie się elementów hepatocytu do tej przestrzeni. Liczne pęczki włókien kolagenowych lokalizowały się w przestrzeniach Dissego i przestrzeniach międzykomórkowych. Obraz ultrastrukturalny hepatocytów był różnorodny. Rzadko obserwowano hepatocyty z cechami martwicy skrzepowej lub rozpływnej. W obumierających hepatocytach występowały liczne, drobne wakuole tłuszczowe. W dość licznych hepatocytach wykazywano ultrastrukturalne wykładniki regeneracji, takie jak: otaczanie mitochondriów kanałami RER, obecność regularnych naprzemiennych układów SER i cząstek α-glikogenu, tzw. „ciałek glikogenowych", i nieregularne obrysy jąder hepatocytów. Najczęściej obserwowano hepatocyty z cechami drobnokropelkowego stłuszczenia i jednoczesnym obrzękiem mitochondriów. W obrzmiałych mitochondriach stwierdzano figury mielinowe (ryc. 6). W wielu hepatocytach obserwowano liczne i nie poszerzone kanały RER oraz skupienia rybosomów i polirybosomów (ryc. 6). W takich hepatocytach widywano wyraźny, a czasem podwójny system Golgiego, a w jego pęcherzykach była obecna wydzielina. Wokół kanalików żółciowych wykazywano liczne lizosomy pierwotne oraz pojedyncze wakuole autofagocytarne. Mitochondria wielu hepatocytów miały wyraźnie przejaśnioną macierz, o nierównomiernej gęstości i wyraźnie skrócone grzebienie. Sporadycznie jednak obserwowano przerwanie ciągłości otoczki zewnętrznej i wewnętrznej mitochondriów (ryc. 6). Rzadko spostrzegano hepatocyty zawierające mitochondria o konformacji skondensowanej (ryc. 7). W tych mitochondriach nie stwierdzono cech obrzęku ani figur mielinowych. Natomiast w hepatocytach zawierających mitochondria o zagęszczonej macierzy obserwowano ponadto nieznaczne poszerzenie kanałów RER oraz cechy jej degranulacji.

Obraz ultrastrukturalny wątroby zwierząt grupy III doświadczalnej był bardzo podobny do przedstawionego w grupie II. Różniła go jedynie bardziej zaznaczona proliferacja kanałów SER (ryc. 8) oraz obecność dość

licznych wakuoli autofagocytarnych, zwykle zlokalizowanych w pobliżu kanalików żółciowych (ryc. 9).

## DYSKUSJA

Zdecydowana większość leków wprowadzonych do ustroju ulega w wątrobie przemianom do form mniej aktywnych lub zupełnie nieczynnych przed, w czasie lub po spełnieniu swego zadania, a następnie są one wyeliminowane zwykle drogą przewodu pokarmowego lub nerek (4). Proces ten jest uzależniony od wielu czynników, także od stanu morfologicznego i czynnościowego systemu detoksykacyjnego hepatocytów, jakim jest gładka sieć endoplazmatyczna. W stanach wymagających nasilenia procesów metabolicznych występuje proliferacja SER, zwiększenie w niej zawartości białka oraz zwiększenie aktywności enzymów (3).

Szczególnie interesująca wydaje się możliwość stymulowania aktywności enzymów systemu MFO i przyspieszania procesów biotransformacji związków egzo- i endogennych. Zjawisko to nosi nazwę indukcji enzymatycznej. Pierwszymi z poznanych induktorów były policykliczne węglowodory aromatyczne, a następnie pochodne kwasu barbiturowego, głównie fenobarbital. Obecnie wykazano indukcyjne działanie wielu leków i związków chemicznych, a liczba ta stale wzrasta (3, 4, 9, 10, 12). Jednak mechanizm indukcji enzymatycznej nie został ostatecznie wyjaśniony. Pod wpływem induktora enzymatycznego dochodzi do zwiększonej syntezy wielu enzymów katalizujących kilka, większość lub nawet wszystkie procesy metaboliczne komórki. Okres indukującego działania substratu-induktora na syntezę enzymów indukcyjnych jest różny i zależy od wielu czynników, takich jak: rodzaj i charakter induktora, czas jego działania oraz szybkość metabolizowania w komórce. Czas trwania uzyskanej indukcji zależy z kolei od trwałości i charakteru indukowanego enzymu lub enzymów oraz prawdopodobnie od wtórnej syntezy swoistego represora komórkowego hamującego uruchomioną indukcję enzymatyczną. W tym wypadku zjawisko indukcji i represji enzymatycznej może być rozpatrywane jako specyficzny stan równowagi dynamicznej między indukcją a represją, a działanie induktora może polegać głównie na hamowaniu czynności represora komórkowego.

Zjawisko indukcji enzymatycznej enzymów zawartych w SER hepatocytów, rozpatrywane od niedawna wyłącznie w aspekcie badawczym, zaczyna wzbudzać zainteresowanie kliniczne. Indukujące działanie fenobarbitalu wykorzystano w leczeniu niektórych postaci niehemolitycznych hiperbilirubinemii i innych żółtaczek z upośledzenia sprzęgania bilirubiny przedwątrobowej z resztami kwasu glikuronowego. Wykazano, że fe-

nobarbital, hydantoinal i butapirazol przyspieszają w wątrobie biotransformację niektórych sterydów endogennych, salicylanów i glikozydów naparstnicy. Hepner i wsp. (cyt. za 3) w oparciu o przeprowadzone badania dowodzą, że istnieje możliwość wpływu fenobarbitalu na wątrobowy metabolizm fosfolipidów u chorych z cholesterolową kamicą żółciową. W oparciu o zjawisko indukcji enzymatycznej SER hepatocytu tłumaczy się działanie hepatotoksyczne rifampicyny stosowanej równocześnie z hydrazydem kwasu izonikotynowego i krótsze działanie leków przeciwzakrzepowych, przeciwpadaczkowych i tolbutamidu u osób nadużywających alkoholu. Dalszy rozwój badań nad indukującym wpływem wielu leków i związków endogennych na enzymy SER hepatocytów może stworzyć większe możliwości ingerencji terapeutycznej w złożone procesy biotransformacji.

Fenobarbital u człowieka i wielu gatunków zwierząt powoduje aktywację enzymów systemu MFO. Indukujące działanie fenobarbitalu polega na pobudzaniu syntezy fosfolipidów i białek i jednoczesnym hamowaniu katabolizmu białek enzymatycznych (14). Wykazano ponadto, że jednoczesne podawanie szczurom fenobarbitalu i $CCl_4$ wywołuje zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych i fosfolipidów w wątrobie (20). W tych warunkach wykazano zaburzenia funkcji mikrosomalnego systemu enzymatycznego, zależnego od fosfatydylocholiny. Fenobarbital wprowadzony do ustroju ulega hydroksylacji, a jego metabolity: parahydroksyfenobarbital i glikuronian fenobarbitalu są wydalane przez nerki w ciągu 24 godz. (5). Po podaniu fenobarbitalu metodami biochemicznymi wykazano zwiększenie aktywności cytochromu P-450, NADPH-cytochromu c-reduktazy, zwiększenie ilości białek mikrosomalnych, RNA i fosfolipidów, a obniżenie aktywności cytochromu $b_5$ i NADP w wątrobie (5, 15). Stwierdzono, że fenobarbital powoduje hydroksylację ewipanu i meprobamatu oraz demetylację amidopiryny. Związki takie, jak antypiryna czy amidopiryna, wprowadzone do ustroju, są łatwo transportowane do wątroby, gdzie ulegają metabolizowaniu. Zmiany ich stężenia we krwi na przestrzeni określonego czasu bądź szybkość i zakres wydalania ich metabolitów z moczem pośrednio, ale dokładnie obrazują wydolność metaboliczną SER i jej systemów enzymatycznych (3).

Wyniki naszych badań morfologicznych i histochemicznych wskazują na intensywną stymulację systemu MFO hepatocytów po zastosowaniu fenobarbitalu. Jest to zgodne z wynikami testu eliminacji amidopiryny z płynu perfundującego izolowaną wątrobę szczurów (3). Wzmożenie intensywności histochemicznego odczynu na glikozo-6-fosfatazę w grupie I doświadczalnej w porównaniu z kontrolą i w grupie III doświadczalnej w porównaniu z grupą II doświadczalną może świadczyć o aktywizacji SER, a pośrednio jej systemu MFO. Glikozo-6-fosfataza jest ściśle zwią-

zana z siecią endoplazmatyczną hepatocytów. Jej fizjologiczna rola polega na katalizowaniu odszczepiania reszty fosforanowej od estru glikozo-6-fosforowego. Zawartość białka enzymatycznego w sieci endoplazmatycznej hepatocytów, a więc również glikozo-6-fosfatazy nie jest stała, wiąże się ściśle ze stanem czynnościowym komórki, zależy od wielu czynników zewnątrz- i wewnątrzpochodnych, a tylko jednym z nich może być wpływ stosowanych induktorów enzymatycznych (14). Stwierdzono jednak, że im silniejsze jest indukujące działanie induktora enzymatycznego, tym bardziej wzrasta zawartość białka SER i tym większa staje się aktywność jej enzymów. Biorąc pod uwagę ten fakt, zachowanie się odczynu na glikozo-6-fosfatazę może określać stan morfologiczny i funkcjonalny SER, a zatem być miernikiem stopnia indukcji (3, 12, 13, 17).

Nasze obserwacje ultrastrukturalne potwierdzają te stwierdzenia: wzmożenie intensywności odczynu na glikozo-6-fosfatazę wiąże się ze znaczną proliferacją SER w hepatocytach w grupach doświadczalnych I i III, natomiast ogniskowe zmniejszenie aktywności glikozo-6-fosfatazy w grupach doświadczalnych II i III towarzyszy znacznemu nasileniu zmian wstecznych w hepatocytach. Obrazy ultrastrukturalne SER w hepatocytach zwierząt grup doświadczalnych I i III świadczą o tworzeniu SER *de novo*, gdyż niewielka średnica kanałów SER i gęste ich ułożenie wyklucza adaptację, uszkodzenie lub przerost SER wynikły ze zmniejszonej jej aktywności (9).

Podobnie jak inni badacze stwierdziliśmy zmniejszenie zawartości RER i glikogenu oraz zwiększenie ilości wakuoli tłuszczowych, figur mielinowych, peroksysomów, lizosomów pierwotnych i wakuoli fagocytarnych w indukowanych hepatocytach zwierząt grup doświadczalnych I i III. Wzrost ilości wakuoli tłuszczowych prostych i figur mielinowych w cytoplazmie hepatocytów można wiązać z wpływem fenobarbitalu na metabolizm lipidów prostych i złożonych. Większa ilość wakuoli autofagocytarnych, a zwłaszcza zawierających kanały SER w swym obrębie, może być morfologicznym wyrazem eliminacji nowo wytworzonej SER przez hepatocyty (7). Nasilanie się tego procesu można traktować jako morfologiczny wykładnik postępującego cofania się indukcji i powrotu hepatocytu do stanu prawidłowego. Obraz morfologiczny i ultrastrukturalny wątroby szczurów grup doświadczalnych II i III dowodzi przewlekłego czynnego jej uszkodzenia (18) ze względu na wielopostaciowość zmian w hepatocytach, postępujące włóknienie z wytwarzaniem się przegród czynnych oraz współistniejące procesy regeneracyjne. Dalszy postęp zmian prowadziłby niezawodnie do rozwoju marskości. W wątrobach szczurów przewlekle traktowanych $CCl_4$ obserwuje się z jednej strony martwicę nielicznych hepatocytów jako skutek przewlekle trwającego uszkodzenia, z drugiej zaś — zmiany regeneracyjne oraz zmiany mogące

być wynikiem wysiłku energetycznego hepatocytów i ich adaptacji do zaistniałego uszkodzenia.

Do tej ostatniej grupy należy zaliczyć zmiany w mitochondriach oraz RER. Mitochondria o konformacji skondensowanej są wyrazem wysokiej bioenergetyki komórki, a brak oznak obrzęku dowodzi sprawności ich systemów energetycznych (9). Jednoczesne poszerzenie kanałów RER i oznaki jej degeneracji w takich hepatocytach mogą być wyrazem upośledzenia biosyntezy białek (2, 8, 9, 16). Podobny obraz hepatocytów obserwowano w przebiegu działania różnorodnych czynników uszkadzających (1, 2, 9), między innymi także we wczesnych fazach działania $CCl_4$ (13). Gromadzenie się licznych nie poszerzonych kanałów RER w hepatocytach oraz oznaki hipertrofii i aktywizacji systemu Golgiego mogą świadczyć o nasilonej syntezie białek. Jednocześnie obecność cech obrzęku w mitochondriach takich hepatocytów przemawia za niesprawnością ich bioenergetyki. Zachowanie ciągłości otoczki zewnętrznej i wewnętrznej w większości tak zmienionych mitochondriów sugeruje jednak odwracalny charakter tych zaburzeń. Ten mozaikowy obraz ultrastrukturalny zaawansowanego uszkodzenia, wstępnego uszkodzenia, adaptacji i regeneracji świadczy o aktywności procesu i tendencjach do odnowy. Ponadto znaczne możliwości indukcji SER w takich hepatocytach, co udowodniono w przeprowadzonym doświadczeniu, świadczą o dość sprawnych mechanizmach biotransformacji i dużych możliwościach adaptacyjnych hepatocytów. Potwierdza to badania Vornego i wsp. (20) wskazując, że fenobarbital może indukować enzymy metabolizujące leki w marskich wątrobach szczurów po uprzednim długotrwałym stosowaniu $CCl_4$.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bini A. i wsp.: Morphological Changes and Free Radical Rate in Early Hepatic Injury from Carbon Tetrachloride and Monobromotrichlorometane. J. Submicr. Cytol. **10** (2), 215, 1978.
2. Chibowski D., Tryksza J.: Badania morfologiczne nad ochronnym wpływem małych dawek czterochlorku węgla na tkankę wątroby. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **35**, 259, 1980.
3. Czarnecki J.: Badania doświadczalne nad interakcją leków i indukcją enzymatyczną wątroby zdrowych szczurów i szczurów po przewlekłym zatruciu czterochlorkiem węgla. Rozprawa habilitacyjna. Klinika Gastroenterologiczna AM. Lublin 1978.
4. Dadan H.: Chirurgiczne postępowanie w długotrwałej cholestazie zewnątrz- i wewnątrzwątrobowej, skojarzone z indukcją enzymatyczną wątroby w świetle badań doświadczalnych i klinicznych. Pol. Tyg. Lek. **38**, 1255, 1983.
5. Fujżama S. J.: Histopathological Study of Hepatic Injury and Following

Regeneration Induced in Rats by Repeated Intraabdominal Administrations of Carbon Tetrachloride. J. Osake City Med. Center. **26** (7—9), 283, 1977.
6. Gans J. H., Korson R., Herman J.: Enhancement by Phenobarbital of Some Effects of Carbon Tetrachloride on Mouse Liver. Biochem. Pharm. v. **25** (5), 557, 1976.
7. Glaumann H., Arborger B., Lindeborg T.: Induction of Liver Lysosomal Enzymes during the Autophagic Phase Following Phenobarbital Treatment of Rat. Virch. Arch. B. Cell. Path. **23**, 17, 1977.
8. Gohbierg S. L., Rasulew N., Arsłanowa N. A.: Wlijanije niekotorych ekstriemalnych wozdiejstwij na submikroskopiczeskuju organizacyju pieczeni krys pri otrawlenii czetyrochłoristym uglerodom. Biull. Eksp. Biol. i Mied. **86**, nr 10, 498, 1978.
9. Johanessen J. V.: Electron Microscopy in Human Medicine. Mc Graw Hill, International Book Company 1978, 2.
10. Kurasz S., Dadan H., Andrzejewska A.: Badania wpływu phenobarbitalu na obraz ultrastrukturalny wątroby psów w warunkach długotrwałej cholestazy zewnątrzwątrobowej. Pat. Pol. **31**, 371, 1980.
11. Kuźma-Grygiel W.: Wpływ witaminy $B_{12}$ na regenerację wątroby bez hepatektomii i po hepatektomii po uprzednim wywołaniu marskości czterochlorkiem węgla. Pat. Pol. **31**, 393, 1980.
12. Orrenius S., Ericksson J. E.: On the Relationship of Liver Glucose-6-phosphatase to the Proliferation of Endoplasmic Reticulum in Phenobarbital Induction. J. Cell Biol. **31**, 243, 1966.
13. Recknagel R. O., Hruszkewyk A. M., Glende E. A.: Absolute Dependence of $CCl_4$ Induced Loss of Glucose-6-phosphatase and Cytochrome P-450 on Lipid Peroxidation. Panmin. Med. **18** (19—10), 375, 1976.
14. Saito R., Estes L. W., Lombardi B.: Reduced Response to Phenobarbital by the Liver of Rats Fed a Choline Deficient Diet. Biochem. Biph. Acta **381**, 185, 1975.
15. Shah S., Pearson D. J.: The Effect of Phenobarbitone on Cytoplasmic NADP-Linked Dehydrogenase Activities in Rat Liver. Biochem. Bioph. Acta **539**, 12, 1978.
16. Sidransky H., Verney E., Murty C. V.: Effect of Tryptofan on Hepatic Polirybosomes and Protein Synthesis in Rats Treated with Carbon Tetrachloride. Toxicol. Appl. Pharmac. **39**, 295, 1977.
17. Smuckler E. A.: Alterations Produced in the Endoplasmic Reticulum by Carbon Tetrachloride. Panmin. Med. **18**, 292, 1976.
18. Wakulin G. M., Jakobson G. C.: Ultrastrukturalnyje izmienienija giepatocytow w dinamikie razwijanija ekspierimientalnogo cirrosa pieczeni u krys. Biull. Eksp. Biol. i Mied. **80** (9), 103, 1975.
19. Willis R. J., Recknagel R. O.: Potentiation by Carbon Tetrachloride of NADPH-dependent Lipid Peroxidation in Lung Microsomes. Toxicol. Appl. Pharmacol. **47**, 89, 1979.
20. Vorne M., Arvela P., Alavaiko: Effect of Phenobarbital on Hepatic Injury Induced by Chronic Carbon Tetrachloride Treatment. Path. Res. Pract. **172**, 372, 1981.

Otrzymano 15 III 1984.

## OPIS RYCIN

Ryc. 1. Wątroba szczura po przewlekłym uszkodzeniu $CCl_4$: a — zapadnięcia zrębu pod postacią przegród biernych w fazie włóknienia, w większości ocalałych hepatocytów cechy stłuszczenia, w nielicznych — cechy regeneracji; b — rozległe zapadnięcia zrębu oraz liczne ocalałe wyspy hepatocytów. Barwienie H+E. Pow. a — 180×, b — 12×.

Ryc. 2. Wątroba szczura: a — zdrowego — drobnoziarnisty odczyn na glikozo-6-fosfatazę widoczny w całej cytoplazmie, brak go w obrębie jąder, nasilony w sąsiedztwie żył centralnych; b — z grupy I doświadczalnej — odczyn na glikozo-6-fosfatazę wzmożony w całym zraziku, brak różnic w intensywności odczynu w poszczególnych jego strefach. Pow. a — 120×, b — 60×.

Ryc. 3. Wątroba szczura: a — z grupy II doświadczalnej — mierna intensywność odczynu na glikozo-6-fosfatazę, całkowity brak go w obrębie jąder i przegród biernych; b — z grupy III doświadczalnej — znaczna intensywność odczynu na glikozo-6-fosfatazę, osłabienie go w hepatocytach zlokalizowanych na obrzeżach guzków regeneracyjnych, a brak go w przegrodach biernych. Pow. a i b — 60×.

Ryc. 4. Wątroba szczura grupy kontrolnej. Kanały RER lokalizują się zwłaszcza wokół mitochondriów i jądra. Gładka sieć endoplazmatyczna (SER) tworzy niewielkie skupienia w biegunie żółciowym hepatocytów. W cytoplazmie widoczne prawidłowe mitochondria (M) oraz skupienia rybosomów i polirybosomów (R). W biegunie żółciowym hepatocytu obecne lizosomy pierwotne (L). Pow. 12 000×.

Ryc. 5. Wątroba szczura grupy I doświadczalnej. Wyraźna proliferacja kanałów SER ze zmniejszeniem ilości RER. Obecne liczne lizosomy pierwotne (L). Kanały i pęcherzyki SER o niewielkiej średnicy. Pow. 12 000×.

Ryc. 6. Wątroba szczura grupy II doświadczalnej. W cytoplazmie hepatocytów obecne liczne niewielkie wakuole tłuszczowe (LV). Mitochondria (M) o ogniskowo przejaśnionej macierzy z obecnością nielicznych figur mielinowych. W niektórych mitochondriach przerwana otoczka zewnętrzna i wewnętrzna (gwiazdka). W cytoplazmie liczne nie poszerzone kanały RER oraz skupienia rybosomów i polirybosomów (R). Pow. 22 500×.

Ryc. 7. Wątroba szczura grupy II doświadczalnej. Mitochondria (M) o zagęszczonej macierzy i prawidłowym obrazie grzebieni i błon. Kanały RER nieznacznie poszerzone. Wyraźne cechy degranulacji RER. W cytoplazmie skupienia wolnych rybosomów (R). Pow. 36 000×.

Ryc. 8. Wątroba szczura grupy III doświadczalnej. Mitochondria (M) wykazują cechy obrzęku. W niektórych mitochondriach figury mielinowe. W cytoplazmie liczne kanały proliferującej SER oraz skupienia nie poszerzonych kanałów RER w sąsiedztwie mitochondriów. Pow. 12 500×.

Ryc. 9. Wątroba szczura grupy III doświadczalnej. Różnej wielkości wakuole autofagocytarne (AV) w cytoplazmie hepatocytu. W niektórych mitochondriach (M) cechy obrzęku. Dość liczne kanały SER o wąskim świetle. Pow. 30 000×.

## РЕЗЮМЕ

Оценено индукцию агранулярного ретикуума (SER) гепатоцитов крыс длительно (хронически) подвергавшихся действию $CCl_4$, а затем подвергнутых действию фенобарбитала, общеизвестного индуктора (SER). В печени животных, которые получали кроме $CCl_4$ также фенобарбитал, ультраструктурным иссле-

дованием обнаружено более интенсивное размножение SER, кроме того также констатировано большую интенсивность гистохимической реакции на глико-6--фосфатазу. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что значительно поврежденная печень крыс $CCl_4$ сохраняет способность к процессам биотрансформации.


## SUMMARY

The induction of SER was estimated in hepatocytes of chronically $CCl_4$-treated rats and then submitted to the action of phenobarbital, a drug generally known as the inductor of SER. Ultrastructurally in the animals treated with $CCl_4$ and then with phenobarbital more intensive proliferation of SER was observed. Histochemical staining showed an increase in the intensity of glucose-6-phosphatase activity in these animals. These results prove that even severely $CCl_4$-injured rat liver preserves the ability to biotransformation processes.


## EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Chronically $CCl_4$ treated rat liver: a — collapsed hepatic stroma with passive septa in fibrosis stage, steatosis in numerous intact hepatocytes is seen, within some hepatocytes are present regeneration features; b — extensive collapsed hepatic stroma and numerous intact foci of hepatocytes. H+E staining. Magn. a — 180×, b — 12×.

Fig. 2. Rat liver: a — healthy rat — positive small granular section to glucose--6-phosphatase within the whole cytoplasm, and lack of positive reaction within nuclei, more intensive reaction is seen in hepatocytes adjacent to central veins; b — Ist experimental rat group — more intensive reaction is seen within whole hepatic lobule, there are no differences in intensity of glucose-6-phosphatase reaction between the zones of hepatic lobule. Magn. a — 120×, b — 60×.

Fig. 3. Rat liver: a — mediocre intensive reaction for glucose-6-phosphatase in liver of IInd experimental rat group, lack of positive reaction in nuclei and passive septa; b — marked intensive reaction for glucose-6-phosphatase in liver of IIIrd experimental group of rats, decreased intensity of reaction within hepatocytes in the peripheral parts of regenerative nodules, lack of positive reaction in passive septa. Magn. a and b — 60×.

Fig. 4. Liver of control group. Canals of RER are present predominantly around mitochondria and nucleus. Smooth endoplastic reticulum SER forms a small concentration within biliary pole of hepatocyte. Within the cytoplasm are seen normal mitochondria (M) and concentrations of rybosomes and polirybosomes (R). Within biliary pole of hepatocyte are present primary lisosomes (L). Magn. 12,000×.

Fig. 5. Rat liver of Ist experimental group. Marked proliferation of canals of SER and decrease of RER. Numerous primary lisosomes are present (L). Canals and follicles of SER display small diameter. Magn. 12,000×.

Fig. 6. Rat liver of IInd experimental group. Within hepatocytic cytoplasm are present small lipid vacuoles (LV). Mitochondria (M) with focal translucent matrix contain small number of myelin figures. There are ruptures of external and internal membranes of some mitochondria (asterisk). Within cytoplasm are seen

numerous normal canals of RER and concentrations of rybosomes and polirybosomes (R). Magn. 22,500×.

Fig. 7. Rat liver of IInd experimental group. Mitochondria (M) with condensed matrix and normal crista and membranes are seen. Canals of RER slightly dilated. Marked features of degranulation of RER. Within cytoplasm are seen concentrations free rybosomes (R). Magn. 36,000×.

Fig. 8. Rat liver IIIrd experimental group. Mitochondria (M) display oedematous features. Within some mitochondria are seen myelin figures. Within cytoplasm numerous canals of proliferating SER and concentrations of normal canals of RER adjacent to mitochondria. Magn. 12,500×.

Fig. 9. Rat liver of IIIrd experimental group. Various size autophagal vacuoles (AV) within cytoplasm hepatocytes are seen. Within some mitochondria (M) features of oedema. Numerous canals of SER with narrow lumens. Magn. 30,000×.

ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA

Nakład 600 egz.+25 nadb., ark. wyd. 29, ark. druk. 24+108 str. wkl. kred. Papier druk. sat. kl. III, B1, 80 g. Oddano do składania w styczniu 1985 r., podpisano do druku w marcu 1987 r., wydrukowano w maju 1987 r. Cena zł 580,—

Tłoczono w Drukarni UMCS w Lublinie, zam. nr 479/86

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXVIII SECTIO D 1983

18. G. Misztal, L. Przyborowski: Application of 2-Thiouracil and 2,4-Dithiouracil for the Determination of Metal Ions, Part I. Spectrophotometric Determination of Copper and Silver.

19. M. Krasowska: The Influence of Injections Prepared in Different Bottles on Selected Indicators of Blood of Experimental Animals.

20. E. Sienkiewicz, A. Wójcik, E. Michelis: Copper Concentration in the Serum of Healthy Population from the Lublin Rural Area.

21. M. Latalski, D. Obuchowska, T. Spruch: Observations of the Ultrastructure of Epithelial Cells of Seminal Vesicles in Rats with Inhibited Gonadotrophic Activity of the Front Lobe of Hypophysis.

22. M. Przyborowska: Optimalization of the Separation of Some Quinoline Derivatives on Formamide-Impregnated Silica Gel.

23. J. Iskierko, A. Górski, T. Wolski: The Application of Derivatizing Reagents for Chromatographic Analysis of Short Peptides.

24. A. Zarębska: The Influence of Biseptol 480 on the Exocrine Cells of the Rat Pancreas after the Excision of Hepatic Lobe.

25. A. Zarębska: The Influence of Hydroxyzine on the Spleen of Female Rats During Pregnancy.

26. S. Umer: Investigation of the Release of the Acetate Cortisone from Ointments by the *in vitro* Method.

27. T. Mastruk-Majewska, T. Błażejewska, W. Zaranko: The Effect of Sefril on Histochemical Response in the Main Tubules of the Rat Kidney.

28. T. Mastruk-Majewska, E. Jach, M. Semczuk: Histochemical Responses in the Rat Liver Due to Administration of Sex Hormones and to Long-term Alcohol Intoxication.

29. D. Misiuna, L. Bielak, S. Biliński: The Acid-base Equilibrium of 4-Methyl-3-R-thiazolone-2-hydrazone Derivatives. V. Ionization Constants of 4-Methyl-R-thiazolidene-2 and β-methyl-β-(4-methylthiazolyl-2)-hydrazides of Acetic and Benzoic Acid.

30. S. Biliński, I. Musik, T. Urban: Reactions of 1-Acyl-4-(p-tolyl)-Thiosemicarbazide with α-halogenketones. I. 4-R-3-(p-tolyl)-thiazol-2-one Hydrazone and 3-Amino-4-R-2-(p-tolylimino)-4-thiazoline.

31. B. Ciszewska-Popiołek, J. Romanowska-Sarlej, G. Rzeszowska, E. Patorska-Mach: The Influence of Catergen on Ethanol-injured Rat Kidneys in the Light of Histochemical Investigations.

32. S. Załuska: Myelin Fibres of the Superficial Branch of the Radial Nerve in the Postfetal Life in Man.

33. S. Załuska: Correlation of Some Elements of the Internal Structure of the Radial Nerve with Age, Height and Body Weight.

34. A. Wójcik, J. Kraczkowski: Tests for Lead Content in the Urine of Pregnant Women in the First Trimester of Pregnancy.

czyt. 4054/59

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXVIII SECTIO D 1983

35. Z. Urbanowicz: Variation of Structure of the Phrenic Nerve and Its Roots in the Postfetal Life of Man.

36. M. Górski, J. Rzymowska: Biological Effect of Selenium Compounds and Pathology of Its Deficiency or Excess in Men and Animals.

37. K. Turowski: The Immediate Results of Operative Treatment in Supratentorial Gliomas.

38. S. Załuska, A. Jasiński, M. Klepacki: Fascicles of the Superficial Branch of the Radial Nerve in the Postfetal Life of Man.

39. A. Drop: Topcontral — A New Form of Stabilized Barium Sulfate Suspension. Clinical Evaluation in the Radiological Diagnostics of Gastrointestinal Tract Examination by the Double-Contrast Method.

40. J. Mieczkowska, J. Hanzlik: Catecholamines in Pathogenesis of Hyperthyreosis.

41. J. Mieczkowska: The Excretion of Catecholamines in Patients with Graves--Basedow Disease and in Those with Hyperfunction of Nodular Goitre after and before Treatment with Propranolol.

42. R. Maciejewski, B. Głuchowska, D. Gieryng: Some Heart Measurements of *Cercopithecus aethiops* and Their Dependence on One Another and External Body Dimensions.

43. K. Turowski: The Remote Results of Operative Treatment in Supratentorial Gliomas.

44. J. Trochimiak: Scientific and Teaching Activity of the Department of Foreign Languages, Medical Academy, Lublin.

45. E. Kapeć, R. Sikorski: The Level of Immunoglobulins in the Cervical Mucus of the Patients with the Infertility of Unknown Etiology.

46. Z. Kleinrok, B. Chmielewska, S. Wójcik: Influence of Lithium Salts on the Concentration of Some Elements in the Tissues of Rats and Chickens.

Adresse:

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
BIURO WYDAWNICTW
Plac Marii
Curie-Skłodowskiej 5 20-031 LUBLIN POLOGNE

Cena zł 580,—