

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

BRUNO BERTO, GIORGIO HASSAN

## Effetti delle alterazioni del capillare biliare sulla sua «colorabilità» con l'acido fosfotungstico

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 568–571.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_6\\_568\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_568_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

*SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Biologia.** — *Effetti delle alterazioni del capillare biliare sulla sua «colorabilità» con l'acido fosfotungstico* (\*). Nota di BRUNO BERTOLINI e GIORGIO HASSAN, presentata (\*\*) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

La colorazione delle sezioni ultrasottili con l'acido fosfotungstico (PTA), dopo eliminazione dell'osmio fissato alle strutture cellulari mediante un processo di ossidazione [1], mette in evidenza, al microscopio elettronico, regioni della membrana plasmatica che sono specializzate da un punto di vista funzionale [2]. Sembra quindi che esista una effettiva relazione tra la possibilità di colorare con questo metodo determinante zone della membrana plasmatica e la loro attitudine funzionale. Si può tentare di portare un ulteriore appoggio a questa ipotesi, esaminando come questo tipo di «colorazione elettronica» si modifichi nel caso di una alterazione funzionale della membrana plasmatica.

Nel fegato il PTA colora la membrana plasmatica che forma il capillare biliare, e la membrana dei lisosomi degli epatociti e delle cellule di Kupffer [2].

Abbiamo quindi creduto opportuno esaminare come questa colorazione si modificasse nell'epatite virale dell'uomo e del topo, cioè in un esperimento fornito dalla natura, in cui la malattia provoca una alterazione della membrana del polo biliare dell'epatocita. Questa alterazione della membrana, che si esprime con una difficoltà da parte dell'epatocita di secernere la bile, è primitiva, a differenza di quella che si determina in seguito ad una ostruzione meccanica delle vie biliari.

La membrana plasmatica che forma il capillare biliare possiede una notevole attività adenosintrifosfatase (ATPase) istochimicamente rivelabile. Questa attività enzimatica è stata studiata in molte ricerche istochimiche, in condizioni capaci di modificare la funzionalità e la struttura di questa regione cellulare [3, 4, 5, 6]. È stato dimostrato che nel danno epatocellulare sperimentale, sia da tossici che da batteri, la scomparsa di questa attività dal polo biliare della cellula epatica è precoce rispetto agli altri segni morfologici e funzionali del danno epatico.

Una simile indagine non è stata invece condotta sulla colorazione al PTA per la microscopia elettronica. Abbiamo perciò ritenuto utile condurre una ricerca comparativa, utilizzando i due metodi sul medesimo materiale, in modo da poter meglio valutare quale potesse essere il significato della colorazione con il PTA, da un punto di vista funzionale.

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma, con il contributo del Gruppo di Ricerca per l'Embriologia (Differenziamento cellulare) del C.N.R., e nel Centro Studi Malattie del Fegato, diretto dal prof. M. Sposito, Ospedale di S. Giacomo, Roma.

(\*\*) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

## MATERIALE E METODO.

Le ricerche sono state eseguite sul fegato dell'uomo e del topo. Il materiale umano è stato ottenuto per agobiopsia del fegato (secondo Menghini) da 20 pazienti affetti da epatite virale e, per confronto, da pazienti che presentavano un ittero ostruttivo extraepatico. Il fegato di topo è stato ottenuto sacrificando 12 topolini infettati con virus epatitico EFH 120 al 14° giorno di età, in condizioni preagoniche. 4 topolini della stessa età sono stati usati come controllo. Una parte del tessuto prelevato era destinato alle tecniche istologiche di routine per la conferma istologica della diagnosi. Tutti i casi sono stati studiati dal punto di vista istochimico al microscopio ottico. Tre casi dei più caratteristici di epatite virale dell'uomo e due casi di epatite virale del topo, oltre ad un controllo di fegato di topo sano, sono stati studiati al microscopio elettronico. Per l'esame istochimico al microscopio ottico, il frammento di tessuto è stato fissato in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4, per due o tre ore, poi sezionato al congelatore. Le sezioni sono state poi trattate secondo il metodo di Wachstein e Meisel per la rivelazione della attività ATPasica [7]. Per la microscopia elettronica, dopo la prefissazione in glutaraldeide, il tessuto è stato rifissato in OsO<sub>4</sub> 2% in tampone fosfato 0,13 M [8], e incluso in Vestopal W o in Araldite. Le sezioni sono state eseguite con l'Ultratome LKB e colorate con idrossido di piombo [9] o con l'acido fosfotungstico, dopo ossidazione [1]. Le fotografie sono state eseguite con il microscopio elettronico Hitachi HU-11.

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

Il risultato più caratteristico della tecnica istochimica per l'ATPasi, nelle forme di epatite virale da noi studiate, è rappresentato dalla diffusa diminuzione o scomparsa dell'attività enzimatica dal polo biliare della cellula, mentre l'attività dell'endotelio sinusoidale non presenta delle modificazioni altrettanto significative (Tav. I, figg. 2 e 6).

Questa alterazione istochimica della membrana plasmatica che forma il capillare biliare è sempre presente nei casi di epatite virale sia dell'uomo che del topo, nelle cellule in cui sia in atto una ritenzione biliare. Questa scomparsa dell'attività ATPasica sembra legata piuttosto alla incapacità funzionale che alla alterazione morfologica del capillare biliare. Infatti l'attività ATPasica persiste inalterata per parecchi giorni o addirittura aumenta nei casi di ritenzione intracellulare dei pigmenti dovuta ad una ostruzione meccanica del coledoco, nell'uomo, nonostante il capillare biliare sia morfologicamente assai alterato (Tav. I, fig. 3). Solo dopo 20-25 giorni si nota anche in questi casi una graduale diminuzione, spesso zonale, dell'attività ATPasica (Tav. I, fig. 4). È possibile pensare che dopo questo periodo, l'ostruzione meccanica delle principali vie biliari abbia determinato, attraverso l'ipertensione biliare, e la ritenzione dei pigmenti, un danno epatocellulare e quindi una alterazione

funzionale secondaria del polo biliare dell'epatocita. Questa alterazione funzionale secondaria si esprimerebbe, appunto, con la scomparsa dell'attività ATPasica, e cioè con un quadro simile a quello dell'alterazione primitiva da epatite virale.

Al microscopio elettronico, nell'epatite virale sia dell'uomo che del topo, il capillare biliare appare rigonfio, ed i microvilli divengono scarsi e di forma irregolare finendo addirittura con lo scomparire (Tav. II, figg. 10 e 11).

Le membrane lisosomiali conservano sempre la loro colorabilità con il PTA, anche quando i lisosomi siano profondamente alterati, dal punto di vista morfologico, per l'accumulo in essi dei pigmenti biliari (Tav. III, fig. 13). Viceversa, in tutti i casi osservati, la membrana plasmatica che forma il capillare biliare perde completamente o parzialmente la sua colorabilità (Tav. II, fig. 9).

Le nostre osservazioni mostrano quindi che l'attività ATPasica e la colorabilità con il PTA della membrana del polo biliare dell'epatocita sono strettamente legate alla sua capacità funzionale. L'epatite virale è stata infatti da noi scelta come un riconosciuto esempio di una incapacità secretiva dell'epatocita nei riguardi della bile.

Per determinare se la scomparsa della colorabilità con il PTA sia tipica soltanto di un danno primitivo del capillare biliare, e non anche di un danno secondario, abbiamo in corso delle esperienze in cui l'impedimento del deflusso biliare sia sicuramente postcellulare (come ad esempio nella interruzione del coledoco).

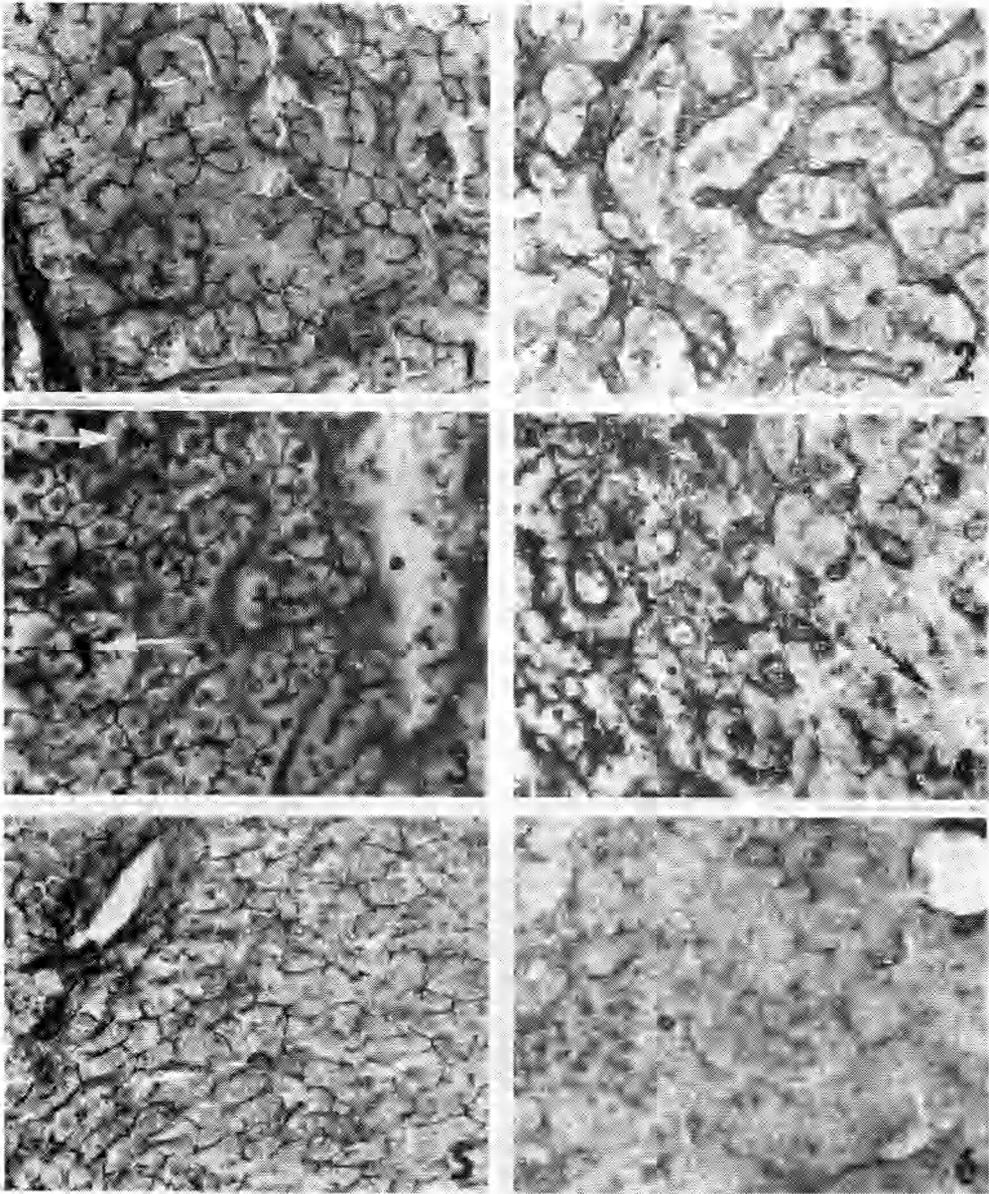
#### CONCLUSIONI.

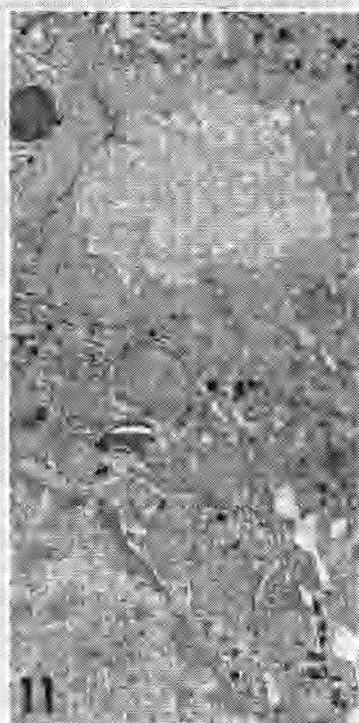
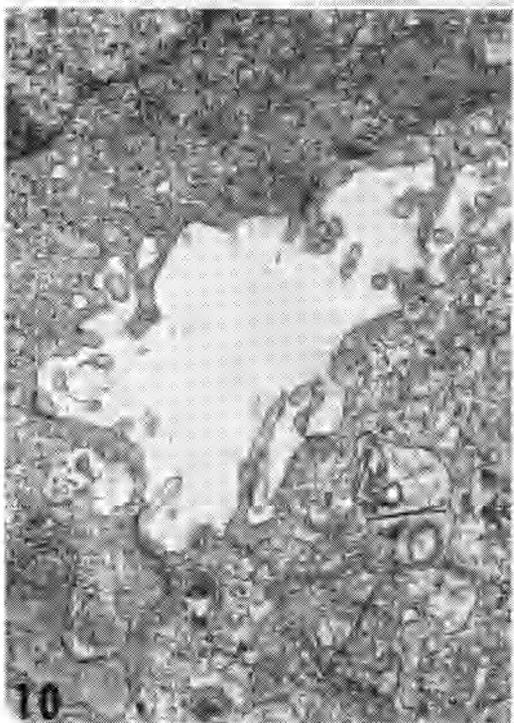
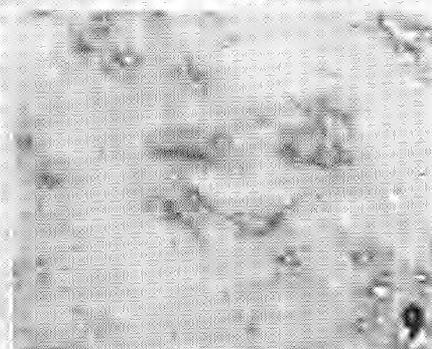
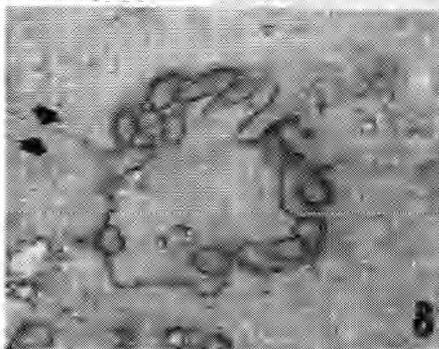
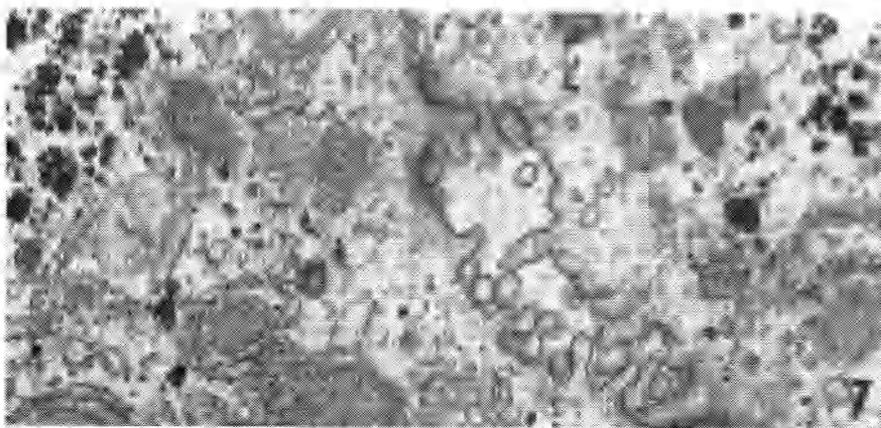
Si può concludere, dai dati finora raccolti, che, nel caso della membrana plasmatica del polo biliare dell'epatocita, la colorabilità con il PTA è effettivamente legata alla sua attività secretoria; la membrana lisosomiale conserva invece la sua colorabilità anche quando i lisosomi siano alterati.

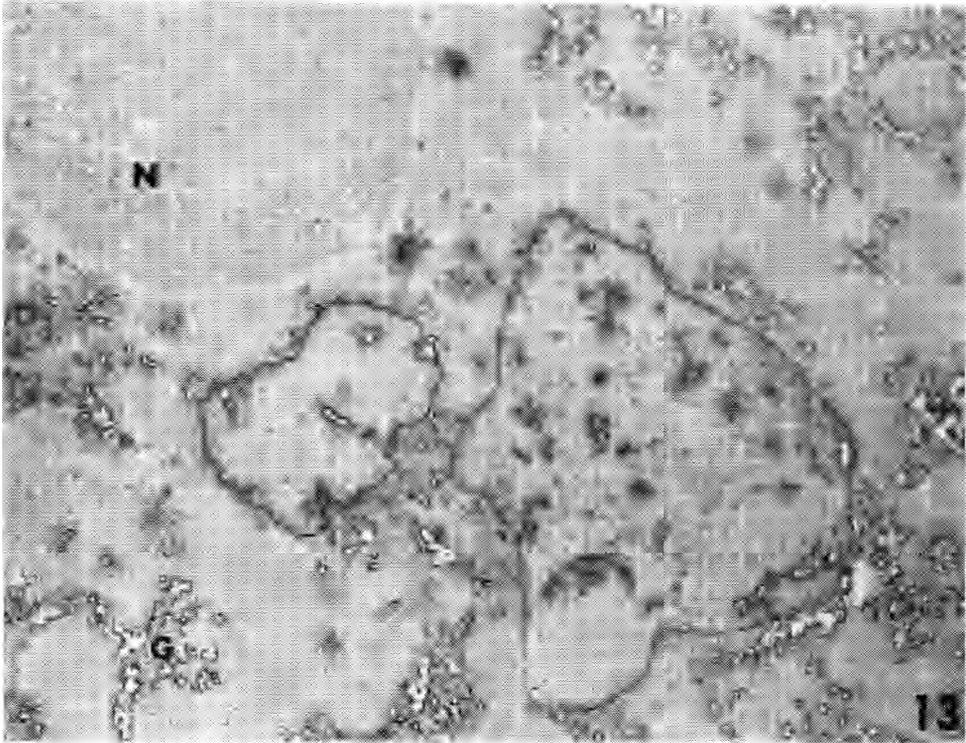
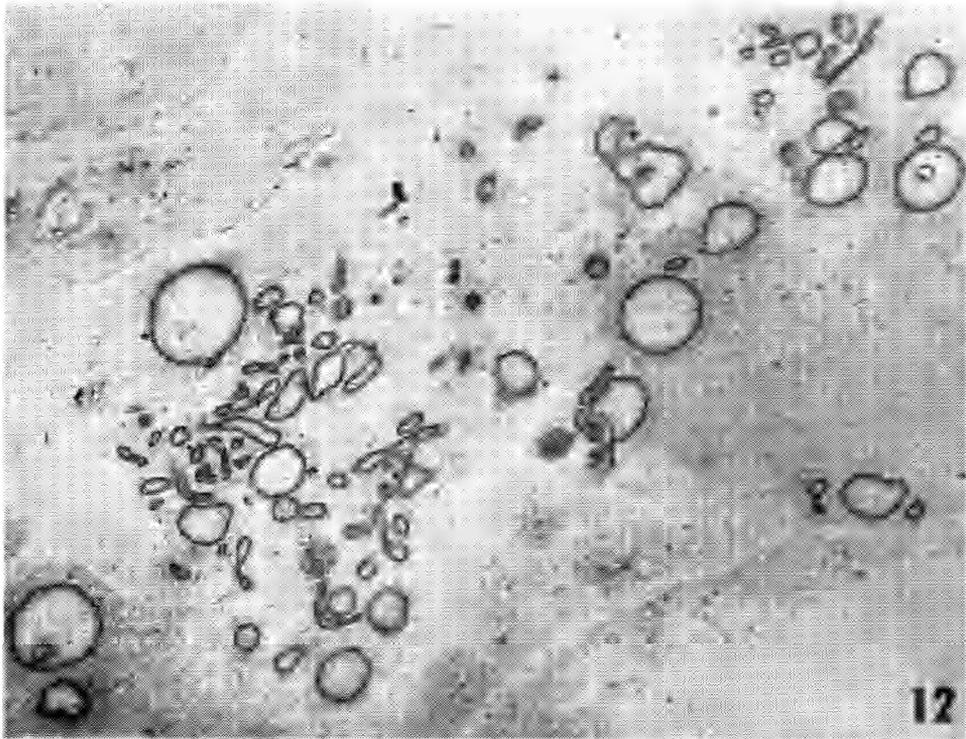
#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] V. MARINOZZI e A. GAUTIER, «C. R. Acad. Sci. (Paris)», 253, 1180 (1961).
- [2] E. L. BENEDETTI e B. BERTOLINI, «J. roy. micr. Soc.», 81, 219 (1963).
- [3] M. WACHSTEIN, E. MEISEL e C. FALCON, «Am. J. Pathol.», 40, 219 (1962).
- [4] M. WACHSTEIN, «Gastroenterology», 37, 525 (1959).
- [5] M. WACHSTEIN in *The liver*, Ch. Rouiller Ed., Vol. I, 164, Academic Press, New York (1963).
- [6] J. H. HOLZNER, «Verhandl. Deutsch. Ges. Pathol.», 44, 233 (1960).
- [7] M. WACHSTEIN e E. MEISEL, «Amer. J. clin. Pathol.», 27, 13 (1957).
- [8] G. MILLONIG, *Electron Microscopy*, 5th Intern. Congr. for Electron Microscopy, S. S. Breese Ed., P. 8, Academic Press, New York (1962).
- [9] M. J. KARNOVSKY, «J. biophys. biochem. Cytol.», 11, 729 (1961).

SUMMARY. — The behaviour of the histochemical ATPase reaction (Wachstein and Meisel) has been studied by light microscopy in the livers of man and mouse, during the course of viral hepatitis. This infection brings about a marked reduction or the disappearance of this enzymatic activity from the bile capillaries. This light microscopical obser-









vation is paralleled, in the electron microscope, by the disappearance of the phosphotungstic acid staining, which is characteristic of the plasma membrane bounding the bile canaliculus. The observations reported here point out the importance of the functional integrity of the biliary pole of the cell in determining its stainability by the two methods used here.

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

### TAVOLA I.

*Metodo di Wachstein e Meisel per l'ATPasica.*

- Fig. 1. - Fegato umano normale; i capillari biliari presentano una intensa attività ATPasica.  $\times 100$  circa.
- Fig. 2. - Epatite virale nell'uomo. La attività enzimatica dei capillari biliari è scomparsa, mentre resta pressoché inalterata quella delle cellule endoteliali dei sinusoidi. Sono evidenti, all'interno degli epatociti, gli accumuli granulari dei prodotti biliari.  $\times 170$  circa.
- Fig. 3. - Ittero ostruttivo nell'uomo; la pressione della bile nel sistema dei dotti escretori provoca la dilatazione e la deformazione dei capillari biliari (freccie); nonostante ciò, dopo un breve periodo (15 giorni circa), la loro attività ATPasica resta costante.  $\times 100$  circa.
- Fig. 4. - Ittero ostruttivo nell'uomo; soltanto dopo un periodo più lungo (2 mesi circa), quando i capillari biliari sono ormai estremamente rigonfi e deformati, la attività enzimatica comincia a scomparire in alcune zone del lobulo epatico (freccia).  $\times 170$  circa.
- Fig. 5. - Fegato di topo normale; una intensa attività ATPasica è rivelabile a livello dei capillari biliari, come nella fig. 1.  $\times 100$  circa.
- Fig. 6. - Epatite virale nel topo; anche in questo caso (come nella fig. 2), l'attività enzimatica è scomparsa a livello dei capillari biliari.  $\times 100$  circa.

### TAVOLA II.

*Fotografie al microscopio elettronico di capillari biliari normali e alterati.*

- Fig. 7. - Fegato di topo normale. Colorazione con idrossido di piombo.  $\times 29.000$ .
- Fig. 8. - Fegato di topo normale. Colorazione con acido fosfotungstico (PTA), dopo ossidazione. In queste condizioni il PTA colora soltanto la membrana plasmatica che forma il capillare biliare. Il resto della membrana plasmatica (fra le due frecce ad esempio) non si colora con questo metodo.  $\times 29.000$ .
- Fig. 9. - Epatite virale nell'uomo. In un capillare biliare alterato la colorabilità con il PTA è quasi completamente scomparsa, e lo è del tutto in quelli ancora più modificati (cfr. con la scomparsa della attività ATPasica nelle stesse condizioni, fig. 2).  $\times 15.000$ .
- Fig. 10. - Epatite virale nel topo. Il capillare biliare è dilatato ed i microvilli sono irregolari ed alterati.  $\times 15.000$ .
- Fig. 11. - Epatite virale nell'uomo. Il capillare biliare è dilatato e ripieno di una sostanza granulosa, ed i microvilli sono quasi completamente scomparsi.  $\times 15.000$ .

### TAVOLA III.

*Colorazione della membrana lisosomiale con il PTA.*

- Fig. 12. - Epatite virale nell'uomo. La membrana dei lisosomi, in una cellula di Kupffer, è intensamente colorata dal PTA.  $\times 26.000$ .
- Fig. 13. - Epatite virale nell'uomo. I lisosomi degli epatociti, nonostante siano profondamente alterati per l'accumulo dei pigmenti biliari, conservano la caratteristica colorabilità della loro membrana con il PTA. (N = nucleo; G = glicogeno, che appare con un contrasto negativo perché parzialmente estratto da questa tecnica di colorazione).  $\times 15.000$ .