

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO HASSAN, BRUNO BERTOLINI

## Sul comportamento dei lisosomi del fegato in alcune alterazioni del metabolismo dei pigmenti biliari

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.1, p. 126–130.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_1\\_126\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_1_126_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.** — *Sul comportamento dei lisosomi del fegato in alcune alterazioni del metabolismo dei pigmenti biliari* (\*). Nota di GIORGIO HASSAN e BRUNO BERTOLINI, presentata (\*\*) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The behaviour of the lysosomes in the human liver affected by viral hepatitis has been studied by means of the histochemical method for the detection of the acid phosphatase activity (Gomori), both in the light and electron microscope. The participation of the lysosomes in the processes of cell necrobiosis has been confirmed, and the alterations of these organules in the liver cells that are not necrobiotic have been referred to the presence and the degree of the intracellular retention of bile pigments.

Uno di noi [1], studiando i fenomeni di ritenzione biliare negli epatociti della lampreda, durante la scomparsa dell'albero biliare legata alla metamorfosi, ha potuto confermare l'intervento dei lisosomi nell'accumulo intracellulare dei pigmenti [2], già osservato nell'ittero ostruttivo dell'uomo. Si osserva in queste condizioni una alterazione della morfologia di questi organuli, che appaiono ingranditi, dilatati, carichi di sostanze a derivazione biliare e sparsi nel citoplasma, avendo perso quella disposizione peribiliare che è caratteristica nelle condizioni normali. Tali fenomeni sono un esempio di esaltazione patologica (da impedita escrezione), della funzione fisiologica dei lisosomi dell'epatocita nei riguardi dei pigmenti biliari che, assunti e modificati dalla cellula, verrebbero secreti attraverso il capillare biliare, dopo essere stati accumulati in questi organuli. Nelle condizioni naturali dell'ittero ostruttivo della Lampreda [1], ed in quelle create dall'esperimento nell'ittero ostruttivo del ratto [3] o nella stimolazione della endocitosi dell'epatocita (con iniezioni di destrano [4] o di Triton WR-139 [5]), il numero dei lisosomi e soprattutto le loro dimensioni sembrano poter variare prontamente in rapporto alle maggiori necessità di una attività di accumulo e di digestione intracellulare. Viceversa, quando l'assunzione di materiale esogeno è depressa, come nell'intestino della rana dopo la metamorfosi, ma prima che abbia avuto inizio la rialimentazione, od in quello del tritone a digiuno [6], il numero dei lisosomi e le loro dimensioni sono nettamente inferiori che nelle condizioni di assorbimento digestivo.

In base a queste premesse abbiamo deciso lo studio, di questi organuli nell'epatocita, in due condizioni differenti per quel che riguarda la alterazione del metabolismo dei pigmenti, ed abbiamo scelto come materiale di studio

(\*) 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. Spósito, Ospedale di S. Giacomo, Roma.

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

il fegato umano in cui sia in corso l'epatite da virus. L'interesse biologico di questa malattia è dato dall'osservazione che essa determina una alterazione del metabolismo e della secrezione dei pigmenti biliari che si accompagna in alcuni casi ad una importante ritenzione di bile negli epatociti, mentre in altri casi questa ritenzione di pigmenti nelle cellule epatiche è scarsa.

I fenomeni di colestasi possono essere bene identificati morfologicamente all'esame istologico, in opportune condizioni di fissazione. È da notare che spesso i fenomeni di colestasi sono limitati ad alcune zone del lobulo epatico, in genere alla zona centrolobulare.

#### MATERIALE E METODI.

Frammenti di fegato umano sono stati ottenuti per agobiopsia con aspirazione, da 20 pazienti, di cui 5 non epatopatici e 15 affetti da epatite virale in fase itterica. Una parte della biopsia veniva in tutti i casi destinata all'esame istologico usuale su sezioni colorate con ematossilina-eosina e col metodo di Van Gieson per il connettivo. La parte rimanente del frammento bioptico veniva destinata allo studio istochimico della fosfatasi acida; a questo scopo la biopsia veniva fissata in glutaraldeide 3% in tampone cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4, a 4°C per due ore. Dopo la fissazione furono ottenute sezioni di circa 10  $\mu$  al microtomo congelatore; alcune fette venivano direttamente osservate senza sottoporle ad ulteriori trattamenti, ed in queste condizioni si ottiene una ottima conservazione del pigmento intracellulare ed è possibile stabilire l'entità della colestasi. Tutte le altre fette venivano trattate in modo da rivelare l'attività fosfatasi acida, con l'incubazione nel mezzo di Gomori a pH 5,0.

In quattro casi di epatite virale sono state incubate nello stesso mezzo anche sezioni di spessore maggiore (50  $\mu$ ), che sono state poi postfissate in osmio ed incluse in Vestopal W, per essere studiate al microscopio elettronico; per un esame morfologico al microscopio elettronico, una parte di ognuna di queste quattro biopsie è stata postfissata direttamente in osmio ed inclusa in Vestopal W. Le sezioni sono state eseguite con l'Ultratome LKB e colorate con idrossido di piombo [8] o con acido fosfotungstico (PTA), dopo ossidazione con acido periodico [9].

#### RISULTATI.

In tutti i casi di epatite virale si osservano profonde modificazioni della morfologia e della distribuzione intracellulare ed intratessutale dei lisosomi. I caratteri più costanti sono:

1° la dispersione intracellulare di questi organuli, che non presentano più una disposizione peribiliare (Tav. I, fig. 3);

2° la presenza di gruppi di cellule epatiche ricchissime di fosfatasi acida, in cui i contorni dei singoli lisosomi non sono più discernibili al micro-

scopio ottico (Tav. I, fig. 2). Questo ultimo aspetto è da riferirsi verosimilmente a fenomeni di necrobiosi cellulare, analoghi a quelli osservati con la stessa tecnica nell'epatite virale del topo [7].

Nelle altre cellule meno gravemente lese i due aspetti della alterazione del metabolismo dei pigmenti, e cioè la scarsità della colestasi o viceversa la notevole colestasi intracellulare, corrispondono a quadri diversi all'esame istochimico. Nelle cellule in cui la ritenzione biliare è scarsa o assente, i lisosomi sono diminuiti di numero, sono di dimensioni normali ed appaiono dispersi nel citoplasma; nelle cellule di Kupffer corrispondenti si nota invece molto spesso una positività intensa della reazione per la fosfatasi acida (Tav. I, fig. 3).

Al microscopio elettronico il fenomeno corrisponde ad un ingorgo nelle cellule di Kupffer di lisosomi ingranditi, talora enormi, contenenti un materiale opaco agli elettroni, e di aspetto estremamente polimorfo (Tav. II, figg. 5 e 6). Questo materiale ha in genere un carattere simile a quello che si accumula nei lisosomi dell'epatocita in caso di ittero da ostruzione delle vie biliari. In questi casi di scarsa colestasi, anche al microscopio elettronico si mettono in evidenza, negli epatociti, dei lisosomi con caratteri morfologici normali, la cui membrana si colora normalmente con il PTA [10], senza segni di accumulo di pigmenti, ma con disposizione intracellulare anomala, e spesso perinucleare (Tav. III, fig. 8).

Nei casi di epatite che decorrono con intensa e diffusa colestasi intracellulare, i lisosomi degli epatociti appaiono aumentati di numero e dimensioni (Tav. I, fig. 4), e tali alterazioni sono in stretto rapporto topografico con le zone di maggior ritenzione biliare; le cellule di Kupffer corrispondenti mostrano un aumento della fosfatasi acida; ma se consideriamo il complesso cellula di Kupffer-epatocita, la maggiore intensità della reazione si ritrova nell'epatocita. Il quadro istochimico in questi casi non è dissimile da quello che si osserva nelle colestasi da ostruzione prolungata delle vie biliari, se si fa eccezione per la presenza, nell'epatite virale, di numerose cellule necrotiche.

#### CONCLUSIONI.

Il danno cellulare provocato dall'infezione virale determina un atteggiamento dei lisosomi nel complesso epatocita-cellula di Kupffer, che appare dipendente dalla presenza e dall'entità della ritenzione di pigmenti biliari negli epatociti. Più precisamente i lisosomi degli epatociti, nelle forme di epatite che decorrono con scarsa colestasi, appaiono diminuiti. Sono invece aumentati di numero e di dimensioni, e carichi di bile, nelle forme in cui si verifica una ritenzione biliare di varia gravità negli epatociti.

Tali modificazioni dei lisosomi sembrano quindi una espressione di adattamento della loro funzione di digestione ed accumulo di materiale esogeno a differenti necessità dell'ambiente cellulare.

Tale ipotesi è rafforzata: 1° dalla somiglianza delle alterazioni morfologiche dei lisosomi nella colestasi di origine infettiva ed in quella di origine ostruttiva meccanica; 2° dalla loro relativa normalità morfologica nei casi di epatite senza colestasi.

Per quanto riguarda le alterazioni delle cellule di Kupffer, le nostre osservazioni al microscopio elettronico propongono la possibilità di una esaltazione patologica della captazione di pigmenti biliari in queste cellule, soprattutto quando tale attività sia depressa nell'epatocita.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] B. BERTOLINI, « *Zeitschr. für Zellforsch.* », 67, 297 (1960).
- [2] E. ESSNER e A. B. NOVIKOFF, « *J. Ultrastruct. Res.* », 3, 374 (1960).
- [3] S. GOLDFISCHER, I. M. ARIAS, E. ESSNER e A. B. NOVIKOFF, « *J. exp. Med.* », 115, 467 (1962).
- [4] S. W. DAEMS e TH. G. VAN RYSSEL, « *J. Ultrastruct. Res.* », 5, 263 (1961).
- [5] R. WATTIAUX, M. WIBO e P. BAUDHUIN, in *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. A. V. S. de Reuck e M. P. Cameron Eds. Churchill, London (1963).
- [6] Osservazioni personali.
- [7] A. C. ALLISON e M. S. BURSTONE, « *Histochemie* », 3, 462 (1964).
- [8] M. J. KARNOVSKY, « *J. biophys. biochem. Cytol.* », 11, 729 (1961).
- [9] V. MARINOZZI e A. GAUTIER, « *C. R. Acad. Sci. (Paris)* », 253, 1180 (1961).
- [10] E. L. BENEDETTI e B. BERTOLINI, « *J. roy. micr. Soc.* », 81, 219 (1963).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

## TAVOLA I.

*Fegato umano; metodo di Gomori per la fosfatasi acida.* Fotografie al microscopio ottico di sezioni di fegato normale (fig. 1) e di fegati affetti da epatite virale (figg. 2, 3, 4).

Fig. 1. - Distribuzione normale dei lisosomi intorno ai capillari biliari.  $\times 110$  circa.

Fig. 2. - Cellule necrobiotiche (alcune indicate dalle frecce); i lisosomi, all'interno di queste cellule, sono così affollati da non essere più distinguibili l'uno dall'altro.  $\times 110$  circa.

Fig. 3. - Assenza di ritenzione biliare negli epatociti; in queste cellule (E) i lisosomi sono di dimensioni normali, ma scarsi di numero e dispersi nel citoplasma. Nelle cellule di Kupffer (K), invece, essi sono ingranditi e fortemente reattivi.  $\times 170$  circa.

Fig. 4. - Ritenzione biliare negli epatociti. I lisosomi degli epatociti (E) sono aumentati di numero e di dimensioni. Anche le cellule di Kupffer (K) mostrano un certo aumento di reattività.  $\times 170$  circa.

## TAVOLA II.

*Fotografie al microscopio elettronico di cellule di Kupffer, in un caso simile a quello rappresentato nella fig. 3.*

Fig. 5. - La cellula di Kupffer (K) sporge nel lume del sinusoidale (Si) ed appare carica di grossi inclusi polimorfi, in cui sono accumulati i prodotti biliari (Ep = epatocita).  $\times 16.000$ .

Fig. 6. - Gli inclusi delle cellule di Kupffer sono positivi alla reazione per la fosfatasi acida, e questo ne indica la natura lisosomiale.  $\times 16.000$ .

## TAVOLA III.

*Fotografie al microscopio elettronico di epatociti; reazione per la fosfatasi acida.*

Fig. 7. - Normale disposizione peribiliare dei lisosomi, che sono positivi alla reazione per la fosfatasi acida (cb = capillare biliare).  $\times 15.000$ .

Fig. 8. - In un caso simile a quello rappresentato dalla fig. 3, i lisosomi appaiono dispersi nella zona perinucleare, invece di essere disposti, come normalmente, intorno al capillare biliare (cb).  $\times 15.000$ .





