

## Colostasi intracellulare pura

### Ricerche ultrastrutturali su due casi di sindrome di Dubin-Johnson e su soggetti anitterici trattati con cloropromazina

P. BARONE

Istituto di anatomia e istologia patologica della università di Messina  
(Direttore: Prof. F. BATTAGLIA)

In redazione il 13. novembre 1965

Il capitolo degli itteri da stasi è stato da tempo distinto nei due grandi gruppi delle colostasi intra ed extraepatiche, soprattutto in base a criteri di ordine morfologico.

ALBOT (1955) ha distinto, sempre in base alla sede dell'ostacolo ostruttivo, tre forme di colostasi intraepatica: intralobulare, perilobulare e sottolobulare (o portale o glissoniana).

Successivamente ALBOT e JEZEQUEL (1962), studiando le alterazioni citologiche e la patogenesi dell'ittero nelle epatiti virali di breve durata, hanno constatato che nei primi giorni dell'ittero non esistono alterazioni ostruttive dei tratti di Hering o dei canali biliari interlobulari, né segni marcati di ostruzione dei canalicoli, né effrazioni nella continuità delle lamine cellulari. Per questi reperti, associati a quello di accumulo intracitoplasmatico di bile, gli AA. si prospettano la ipotesi che l'ittero possa essere dovuto, in tali casi, ad una inibizione secretoria dell'epatocita. Anche POPPER e Coll. (1963) hanno accennato alla possibilità che alla base di alcuni itteri possa esservi una alterazione dei meccanismi secretori della cellula epatica.

Nel corso di uno studio eseguito su due fratelli affetti da una tipica sindrome di Dubin-Johnson-Rotor e su otto individui trattati con *cloropromazina*, abbiamo osservato un insieme di alterazioni citologiche che ben si accordano con la ipotesi suddetta e per le quali siamo stati indotti ad ammettere la esistenza di una colostasi che, per il fatto di interessare esclusivamente il sistema dei canalicoli intracellulari, abbiamo definito col termine di colostasi intracellulare pura.

### Materiali e metodi

La casistica da noi studiata comprende otto soggetti schizofrenici trattati con cloropromazina per lungo periodo di tempo (da uno a tre anni). In tutti i casi non si apprezzavano segni clinici di insufficienza epatica; la bilirubina era nei limiti del normale e le prove di sierolabilità colloidale, tranne in tre soggetti — nei quali si è osservata una discreta positività della reazione di McLagan — solo modicamente alterate.

Per le nostre ricerche abbiamo scelto soggetti anitterici e con minimi segni di disfunzione epatica, allo scopo di studiare le più fini modificazioni delle cellule epatiche dovute alla cloropromazina, il che riesce evidentemente meno agevole nelle conclamate manifestazioni itteriche legate alla somministrazione di questo farmaco.

Sono stati anche studiati due fratelli affetti da una tipica sindrome di Dubin-Johnson-Rotor, il cui completo studio clinico, morfologico ed istochimico è stato altrove riferito [BARONE, INFERRERA e TIGANO (in corso di stampa)]. I frammenti biotici sono stati ottenuti con agopuntura ed in parte fissati in formalina, per la microscopia a luce, in parte fissati in OsO<sub>4</sub> all'1% tamponato sec. Palade a pH 7,3, disidratato in acetone ed incluso in miscela di metacrilato (4:1). Una parte dei frammenti è stata inclusa in miscela maraglas sec la tecnica suggerita da FREEMAN e SPURLOCK (1962).

Le sezioni ultrafini, ottenute con lama di vetro al microtomo Leitz, sono state contrastate al piombo ed osservate al microscopio elettronico Elmskop della Siemens e Halske ed al Philips E.M. 75.

### Reperti istologici

*Soggetti trattati con cloropromazina.* In complesso le alterazioni riscontrate sono apparse trascurabili e, ad eccezione di un sensibile rigonfiamento degli epatociti con vacuolizzazione del citoplasma (più evidente in due soggetti), il quadro istologico si sarebbe potuto definire pressoché normale. In cinque casi si è osservata una modesta steatosi ed in tre qualche accenno ad attivazione istioide negli spazi porto-biliari. In tutti i frammenti si è notata una moderata pigmentazione lipofuscinica nei territori parenchimali perivenosi (centrolobulari). Non si sono osservati trombi biliari.

*Soggetti con sindrome di Dubin-Johnson-Rotor.* In entrambi i frammenti il quadro istologico è risultato simile. Le lamine cellulari sono ordinatamente disposte e non si osservano fenomeni flogistici e segni di ostruzione delle vie biliari. Nel citoplasma delle cellule epatiche si osservano granuli di pigmento di colorito che va dal giallo-ocra al bruno, disposti generalmente in prossimità del polo biliare della cellula. Tali granuli sono più abbondanti in corrispondenza dei territori perivenosi (pericentrolobulari). Istochimicamente questo pigmento è risultato essere analogo alle lipofuscine [BARONE e Coll. (in corso di stampa)]. Oltre alla pigmentazione parenchimale l'elemento di maggiore rilievo è offerto dalla intensa vacuolizzazione, del citoplasma, la cui struttura estremamente rilassata gli conferisce un aspetto simil-vegetale. Il rigonfiamento e la vacuolizzazione citoplasmatici sono risultati molto più marcati nelle biopsie eseguite dopo 24 ore dalla prova di carico con bromosulfaleina anziché nelle biopsie praticate tre mesi più tardi. Pertanto si ha, l'impressione che il carico con bromosulfaleina accentua notevolmente il preesistente rigonfiamento citoplasmatico. Il contenuto in glicogeno è risultato pressoché normale; rare e minute goccioline di grasso si sono osservate nelle sezioni al congelatore.

### Reperti ultrastrutturali

*Soggetti trattati con cloropromazina.* Al microscopio elettronico si sono riscontrate costanti alterazioni degli epatociti soprattutto a carico del reticolo endoplasmico, della zona del Golgi e, in genere, delle porzioni citoplasmatiche prossime al capillare biliare.

L'ergastoplasma è notevolmente ridotto e i suoi scarsi residui sono distorti e poveri (o del tutto privi), di granuli ribosomici. Il reticolo liscio mostra una diffusa trasformazione vacuolare in genere più evidente nelle zone prossime al capillare biliare (Fig. 1 a). Nei vacuoli si rinviene spesso una sostanza granulare, dalla quale sembrano trarre origine per successive trasformazioni i tipici aggregati lipofuscinici. Questi sono caratterizzati da aree lucide centrali, circondate da mantelli periferici di materiale fortemente denso agli elettroni (Fig. 4).

In altri vacuoli si rinviene una sostanza a costituzione lamellare, che per le sue caratteristiche, deve essere considerata come bile (Fig. 1 b).

La zona di Golgi partecipa al processo con le stesse alterazioni descritte a carico del reticolo endoplasmico: anche qui si rinvengono vescicole in parte vuote

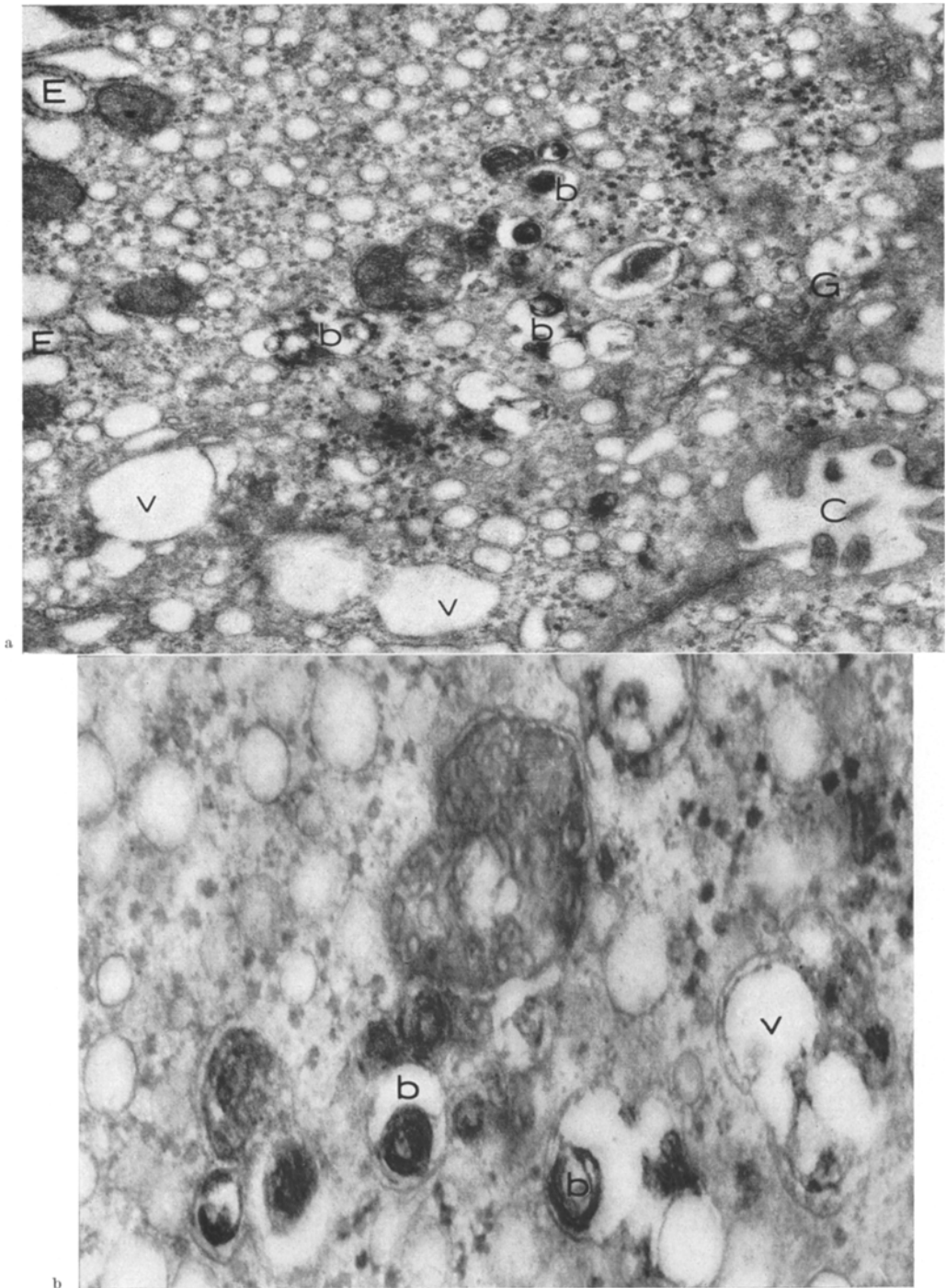


Fig. 1. Soggetto trattato con clorpromazina. L'ergastoplasma (*E*) è notevolmente ridotto mentre nel reticolo endoplasmico si osservano numerosi vacuoli (*V*) in parte contenenti materiale biliare (*b*). *C* capillare biliare; *G* zona die Golgi. a 42000  $\times$ ; b 80000  $\times$

ed in parte contenenti materiale denso a costituzione granulare o lamellare (bile) (Fig. 2).

È interessante notare che, in contrasto con queste cospicue alterazioni del reticolo endoplasmico, dell'apparato di Golgi e della zona pericanalicolare, i capillari biliari si presentano poco o affatto alterati sia per quanto si riferisce al loro calibro che alla disposizione e alla struttura dei microvilli (Fig. 1).

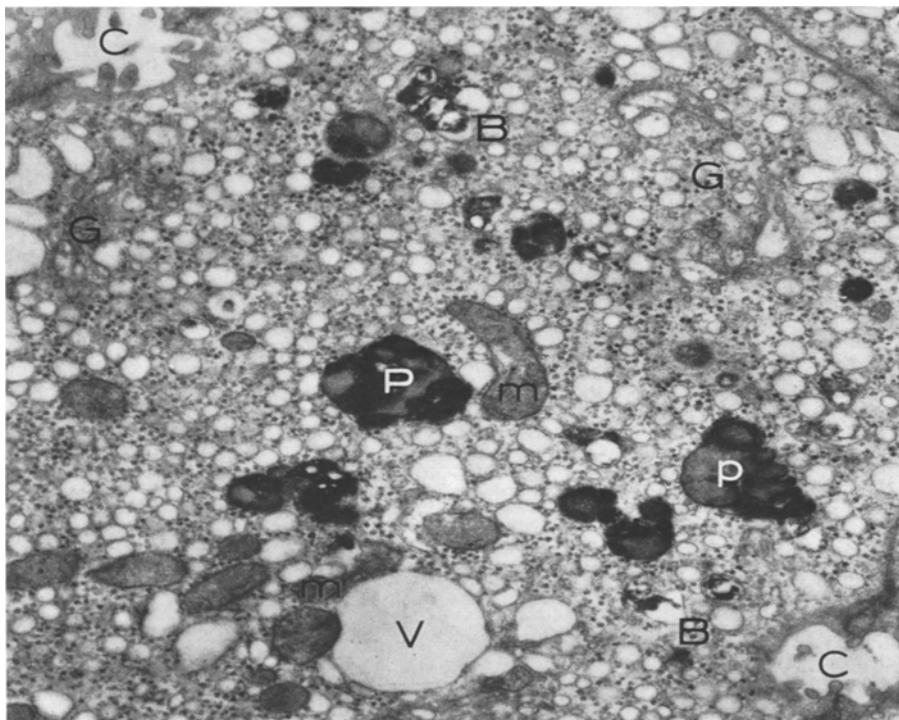


Fig. 2. Soggetto trattato con clorpromazina. Porzioni di epatocita ai cui lati si osservano due capillari biliare (C). In alcuni vacuoli si osserva materiale a struttura simil-biliare. G zona del Golgi; P pigmento lipofuscinico; m mitocondri. 23500 ×

I mitocondri sembrano, in molte cellule, diminuiti di numero, ma è probabile che questa impressione derivi, almeno in parte, dal rigonfiamento del reticolo endoplasmico. Strutturalmente, a carico dei mitocondri, si sono osservate moderate modificazioni di forma e di volume con una sensibile riduzione delle creste. In qualche caso si sono visti residui di mitocondri inclusi in formazioni simil-lisomiali (Fig. 2).

*Soggetti con sindrome di Dubin-Johnson.* I reperti osservati al microscopio elettronico possono essere così raggruppati:

1. Reticolo endoplasmico. L'ergastoplasma è ridotto, distorto e con scarsi granuli ribosomici. Il reticolo liscio è abbondante e con notevole trasformazione vacuolare, più evidente nelle prime biopsie eseguite dopo carico con bromosulfaleina (Fig. 3).

2. Accumulo di pigmento. Negli aggregati pigmentari di maggiori dimensioni si distingue una matrice moderatamente opaca nel cui contesto si osservano

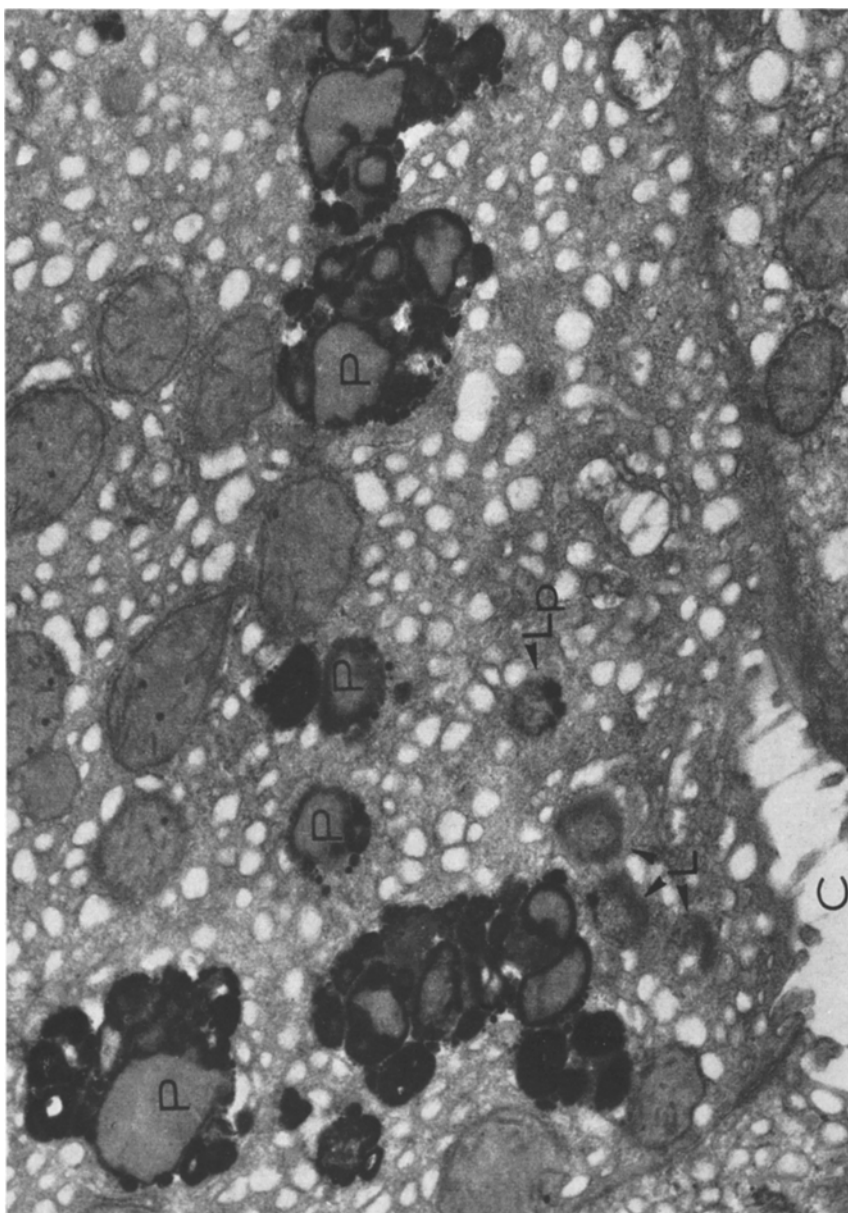


Fig. 3. Sindrome di Dubin-Johnson-Rotor. Su formazioni lisosomiche (*L*) sembra avvenire la deposizione di granuli fortemente opachi (*Lp* lisosomi pigmentati). In questi ultimi si differenzia poi un'area centrale chiara ed una periferica e si giunge in tal modo alla costituzione di piccole unità lipofusciniche (*P*) che confluiscono successivamente in più grossi aggregati pigmentari. 32000  $\times$

aree lucide amorphe e fini granuli con più forte densità elettronica (Fig. 3). Tali granuli si rinvencono generalmente alla periferia della massa pigmentaria od anche liberi nello ialoplasma immediatamente circostante, così che si ha la impressione di una loro progressiva opposizione agli ammassi pigmentari già costituiti. La Fig. 3 dimostra i probabili stadi di passaggio nella costituzione dei più grossi aggregati pigmentari.

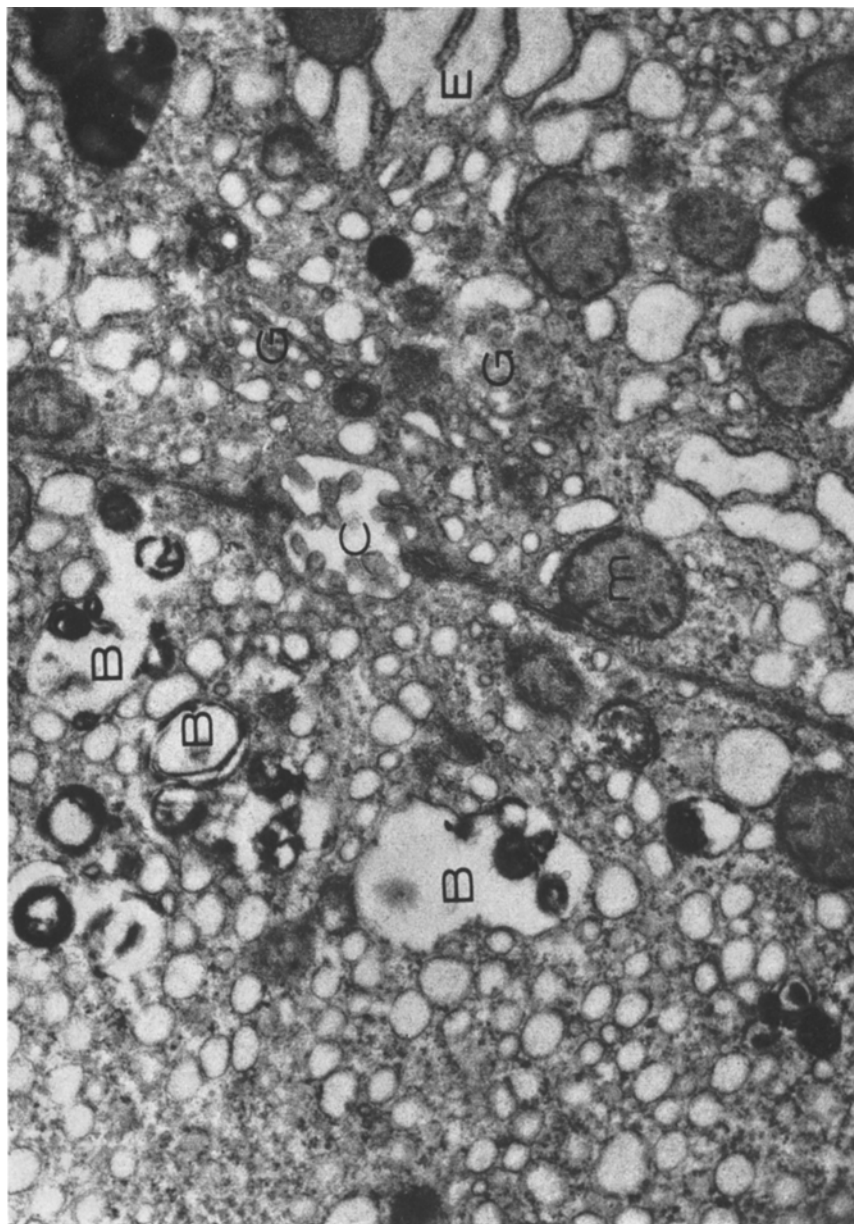


Fig. 4. Sindrome di Dubin-Johnson-Rotor. Numerosi vacuoli contenenti bile (B) si trovano disposti in prossimità di un capillare biliare (C) non dilatato e con microvilli normali. G zone di Golgi, con vescicole in parte riplete di materiale elettro-denso, M mitocondri, E residui di ergastoplasma. 30.500 x

3. Accumulo di bile. Nelle vescicole del reticolo endoplasmico ed in quelle della zona del Golgi si riscontra, frequentemente, l'accumulo di materiale denso a struttura lamellare che riproduce perfettamente le immagini che si osservano nella colostasi e che viene comunemente riferito all'accumulo intracellulare di bile (Fig. 4).

4. L'apparato di Golgi è ben evidente e mostra vescicole dilatate e spesso contenenti materiale denso di aspetto granulare o con struttura simil-biliare.

Si ricava pertanto l'impressione che la zona del Golgi partecipa al processo con modificazioni analoghe a quelle osservabili a carico del reticolo endoplasmico.

5. Mitocondri. Si riscontrano frequentemente una riduzione numerica dei mitocondri e loro immagini alterative consistenti in irregolarità di forma, diminuzione delle creste e fine vacuolizzazione o smescolamento della matrice. In qualche mitocondrio si sono osservati aspetti di degenerazione fibrillare (Fig. 5).



Fig. 5. Sindrome di Dubin-Johnson-Rotor. Mitocondrio con immagini di degenerazione fibrillare. 32000 ×

6. I capillari biliari non mostrano sensibili modificazioni del loro calibro e non contengono materiale biliare. I microvilli sono normalmente rappresentati e non mostrano alterazioni strutturali di rilievo (Fig. 4).

*Discussione dei reperti.* I reperti ultrastutturali da noi osservati in soggetti anitterici trattati con clorpromazina dimostrano l'esistenza di costanti alterazioni dell'epatocita consistenti in diminuzione dell'ergastoplasma, vacuolizzazione del reticolo endoplasmico e dell'apparato di Golgi e nell'accumulo, in queste strutture, di materiale di natura biliare. Poiché tali reperti non si associano a sensibili modificazioni istologiche ed, in particolare, a processi infiammatori od ostruttivi delle vie biliari o a presenza di trombi biliari, si deve ammettere che

la colostasi intracellulare, osservata in questi casi, costituisce la conseguenza di una primitiva alterazione dei meccanismi secretivi cellulari. Questa ipotesi ben si accorda con la constatazione della transitoria ritenzione di bromosulfaleina descritta in soggetti sani dopo somministrazione di clorpromazina.

Una caratteristica ritenzione di B.S.F. si verifica anche nella sindrome di Dubin-Johnson associata a iperbilirubinemia diretta ed indiretta, a scarsa o assente visualizzazione della colecisti, con i comuni mezzi di contrasto, e allo accumulo di pigmento lipofuscinico nelle cellule epatiche. Quest'ultimo fenomeno non sembra però direttamente connesso con il difetto secretivo, perché sono stati osservati casi senza pigmentazione parenchimale (sindrome di Rotor) o con modesta pigmentazione [ARIAS 1961; BARONE, INFERRERA e TIGANO (in corso di stampa)].

Poiché istologicamente non si sono riscontrate alterazioni infiammatorie od ostruttive, anche l'ittero anemolitico tipo Dubin-Johnson-Rotor viene comunemente interpretato come conseguenza di un congenito difetto della escrezione della bilirubina dalla cellula epatica. Anche per quanto riguarda le poche indagini al microscopio elettronico, ci sembra che l'attenzione dei ricercatori sia stata polarizzata dal più vistoso fenomeno della pigmentazione parenchimale e che minore importanza sia stata rivolta alla ricerca di un quadro di assieme delle più fini alterazioni citologiche che potessero offrire una base morfologica ad una malattia tuttora comunemente considerata espressione di un puro disordine biochimico. Soltanto alcuni AA. hanno riferito alterazioni del reticolo endoplasmico [UEDA (1962); ICHIDA e FUNAHASHI (1964); COPPO e Coll. (1964)] ed un accumulo intracellulare di bile è stato solo recentemente descritto [MINIO e Coll. (1965); BARONE e Coll. (in corso di stampa)].

Nelle due osservazioni di sindrome di Dubin-Johnson-Rotor abbiamo messo in evidenza una serie di reperti ultrastrutturali che possono essere così riassunti: 1. riduzione del reticolo granulare; 2. estesa frammentazione del reticolo endoplasmico e dell'apparato del Golgi; 3. presenza nelle cellule epatiche di due tipi di pigmento, lipofuscinico e biliare, che si accumulano inizialmente nelle vescicole del reticolo endoplasmico e dell'apparato di Golgi; 4. diminuzione di numero dei mitocondri con alterazioni di vario tipo e con non frequenti immagini di degenerazione fibrillare; 5. assenza di sensibili alterazioni del calibro dei capillari biliari e del numero e della struttura dei microvilli.

È interessante notare che, analogamente a quanto riscontrato nei soggetti anitterici trattati con clorpromazina, le modificazioni ultrastrutturali riguardano essenzialmente il reticolo endoplasmico, l'apparato di Golgi e la zona pericanalicolare, cioè quelle strutture che vari elementi inducono a ritenere il substrato morfologico ove si svolgono i complessi ed ancora poco noti meccanismi biochimici che presiedono alla formazione del secreto cellulare, al suo trasporto attraverso la cellula e alla sua escrezione dall'epatocita nel capillare biliare. In entrambe le evenienze patologiche da noi studiate si documenta un dimostrativo esempio di colostasi che interessa esclusivamente la cellula epatica e che, pertanto, abbiamo definito col termine di colostasi intracellulare pura. In precedenti ricerche [BARONE e FINOCCHIO (1962)] avevamo accertato la esistenza di estroflessioni o diverticoli dei capillari biliari ed avevamo espresso la opinione che essi si pongono intermittenemente in comunicazione con i vacuoli della regione pericanalicolare,



intervenendo in tal modo nella escrezione del secreto cellulare, probabilmente con un meccanismo inverso a quello della pinocitosi. Questi diverticoli od estroflessioni rappresentano, verosimilmente, una sorta di tratto intermedio che collega i capillari biliari con il sistema dei canalicoli intracellulari, rappresentati dal reticolo endoplasmico e dalla zona del Golgi, che nel loro insieme possono essere considerate come le prime radici del sistema biliare, essendo funzionalmente deputate alla elaborazione e al trasporto intracellulare del prodotto di secrezione.

In condizioni normali queste minime vie biliari intracellulari possono essere seguite con difficoltà, ma esse risultano al contrario ben evidenti quando si determina un ostacolo alla secrezione biliare.

Dai nostri reperti non è possibile stabilire con precisione in quale parte della cellula si verifichi l'ostacolo alla eliminazione della bile. Teoricamente un tale ostacolo potrebbe verificarsi in sede di elaborazione (verosimilmente nell'ergastoplasma), o durante il trasporto intracellulare (reticolo endoplasmico e apparato di Golgi), ovvero in sede di escrezione (zona pericanalicolare e membrana cellulare). Le due ultime ipotesi sembrano essere le più probabili. In ogni modo risulta chiaro che, accanto a forme di colostasi riferibili a fenomeni flogistici od ostruttivi delle vie biliari extraepatiche od intraepatiche, deve ammettersi la esistenza di una colostasi che interessa primitivamente la cellula epatica e che può pertanto essere definita col termine di colostasi intracellulare pura.

La possibilità di una colostasi dovuta ad una esclusiva o prevalente alterazione della cellula epatica è stata di recente ammessa da alcuni AA. nella interpretazione di alcune manifestazioni itteriche dovute a determinati farmaci [POPPER e SCHAFFNER (1963); SMETANA (1963); SCHAFFNER e KNIFFEN (1963); e SMETANA (1963)] ha valorizzato la natura sterolica del farmaco che potrebbe, verosimilmente, interferire nella secrezione biliare con un meccanismo competitivo.

Per quanto si riferisce alla patogenesi della colostasi in corso di trattamento con clorpromazina, o determinata da altre sostanze tossiche, si è anche espressa l'ipotesi [SMETANA (1963)] che il ristagno biliare possa essere conseguente ad un ostacolo nella escrezione della bile dalla cellula con consecutiva diminuzione della pressione di secrezione e richiamo di bile per capillarità nei canalicoli. L'aspetto morfologico di una colostasi primitivamente intracellulare verrebbe in tal caso a modificarsi assumendo i caratteri più noti delle comuni colostasi intraepatiche. Tale evoluzione si osserva, appunto, nelle conclamate manifestazioni itteriche da clorpromazina.

È assai verosimile che molte forme di colostasi intraepatica, sino ad oggi interpretate quali conseguenze di una ostruzione nei fini duttuli o nei capillari biliari, vadano invece più correttamente considerate quali conseguenze di una primitiva colostasi intracellulare.

Questa ipotesi che sembra dimostrata per alcune forme di intossicazioni (clorpromazina, derivati del testosterone, eritromicina etc.), deve essere anche tenuta presente nella interpretazione di alcuni itteri congeniti, come ad es. quello osservabile nella sindrome di Dubin-Johnson-Rotor.

### Riassunto

Lo studio elettromicroscopico su ago-biopsie epatiche di due fratelli affetti da sindrome di Dubin-Johnson-Rotor di otto soggetti anitterici trattati con

cloropromazina ha messo in evidenza, in entrambe le situazioni patologiche, analoghe alterazioni del reticolo endoplasmico, dell'apparato del Golgi e della zona pericanalicolare con accumulo intravacuolare di materiale biliare. Poiché non si sono osservate alterazioni ostruttive o infiammatorie dei dotti biliari, né presenza di trombi nei capillari biliari, si ammette che la colostasi intracellulare che si osserva in tali casi sia da riferire ad una primitiva alterazione dei meccanismi secretivi cellulari. I reperti descritti ben si accordano con la ipotesi che alla base dell'ittero cronico idiopatico si verifichi un blocco nella escrezione della bilirubina dalla cellula epatica nel capillare biliare.

### **Reine intracelluläre Cholestase**

#### **Untersuchungen der Ultrastruktur in zwei Fällen mit Dubin-Johnson-Syndrom und acht anikterischen, mit Chlorpromazin behandelten Fällen**

##### **Zusammenfassung**

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte in beiden Gruppen ähnliche Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums, des Golgi-Apparates und der perikanaliculären Zone mit intracellulärer Anhäufung von Galle. Da weder obstruierende, noch entzündliche Veränderungen an den Gallengängen, noch Gallethromben in den Gallecapillaren beobachtet werden konnten, wird angenommen, daß die nachgewiesene intracelluläre Cholestase auf eine primäre Beeinträchtigung des cellulären Sekretionsmechanismus zurückgeht. Die Befunde stimmen mit der Hypothese überein, daß der chronische idiopathische Ikterus auf ein Hindernis bei der Ausscheidung des Bilirubins durch die Leberzellen in die Gallecapillaren zurückzuführen ist. Diese Fälle wären zu definieren als rein intracelluläre Cholestase auf dem Boden eines primären Leberzellschadens.

### **Pure intracellular cholestasis**

##### **Summary**

The electronmicroscopic study of the hepatic needle biopsies of two brothers affected by Dubin-Johnson-Rotor syndrome and of eight subjects without jaundice treated with chlorpromazine showed similar changes of the endoplasmic reticulum of the Golgi apparatus and of the pericanalicular zone with intravacuolar storage of bile. As neither obstructive or inflammatory alterations of the bile ducts nor presence of thrombi in the biliary capillaries were observed, it is suggested that the intracellular cholestasis observed is due to a primitive alteration in the cellular secretory mechanism. The findings described agree with the hypothesis that the chronic idiopathic jaundice is caused by an obstruction in the excretion of bilirubin from the hepatic cells into the biliary capillaries. These cases may be defined as a pure intracellular cholestasis, on the basis of primary damage of the liver cell.

##### **Bibliografia**

- ALBOT, G.: Les formes anatomo-cliniques de la cholestase intrahépatique chronique. Le foie et la veine porte. Paris: Masson & Cie. 1955.  
 —, et A. M. JEZEQUEL: Ultrastructure du foie et pathogénie de l'ictère au cours des hépatites virales. Les ictères. Paris: Masson & Cie. 1962.  
 ARIAS, I. M.: Studies of chronic familial non-hemolytic jaundice with conjugated bilirubin in the serum with and without an unidentified pigment in the liver cells. Amer. J. Med. **31**, 510 (1961).

- BARONE, P., e F. FINOCCHIO: Ricerche morfologiche e ultrastrutturali sui diverticoli intracellulari dei capillari biliari. *Arch. ital. Anat. Istol. Pat.* **36**, 366 (1962).
- C. INFERRERA e F. TIGANO: Studio clinico, istochimico ed ultrastrutturale su due casi di sindrome di Dubin-Johnson-rotor. *Arch. Ital. Anat. Istol. rat.* (in corso di stampa).
- COPPO, M., M. T. AGNOLUCCI e U. MUSCATELLO: Osservazioni sulla sindrome di Dubin-Johnson. *Boll. Soc. med.-chir. Modena* **64**, 1 (1964).
- DUBIN, I. N., and F. B. JOHNSON: Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells. *Medicine (Baltimore)* **33**, 151 (1954).
- FREEMAN, J. A., and B. O. SPURLOCK: Maraglas epoxy embedding media. *Fifth Internat. for Electron Microscopy, Philadelphia* **2**, 11 (1962).
- ICHIDA, F., and H. FUNAHASHI: Electron microscopic observations on liver cells of cases with Dubin-Johnson syndrome. *Acta hepato-splenol. (Stuttg.)* **11**, 332 (1964).
- MINIO, F., P. MAGNENAT, D. GARDIOL et A. GAUTIER: Ultrastructure du foie humain lors d'ictères idiopathiques chroniques. *Z. Zellforsch.* **65**, 47 (1965).
- POPPER, H., F. SCHAFFNER, T. BARKA, and F. PARONETTO: Mechanism of intrahepatic cholestasis in drug-induced hepatic injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 988 (1963).
- ROTOR, A., L. MANAHN, A. FLORENTIN: Familial non-hemolytic jaundice with direct van den Bergh reaction. *Acta med. philipp.* **5**, 37 (1948).
- SCHAFFNER, F., and J. C. KNIFFEN: Electron microscopy as related to hepatotoxicity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 847 (1963).
- SMETANA, H. F.: The histopathology of drug-induced liver disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 821 (1963).
- UEDA, H.: Fine structure of the liver in constitutional hyperbilirubinemia. *2nd World Congr. of Gastroenterology, Munich* **3**, 198 (1962).

Dr. P. BARONE  
Istituto di Anatomia e Istologia  
Patologica dell'Università di Messina  
Messina (Sizilien), Italien  
Via Pietro Castelli