

# Açlıkta Fare Hepatositlerinin İnce Yapısında Gözlenen Değişimler

## THE CHANGES OBSERVED ON THE ULTRASTRUCTURE OF MOUSE HEPATOCYTES IN THE STARVATION

Elvan ÖZBEK\*

\* Yrd.Doç.Dr., Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, ERZURUM

### Özet

Açlığın 6. ve 24. saatlerindeki fare hepatositlerinde, karbonhidrat ve lipid metabolizmasına dayalı ultrastrüktürel değişiklikleri incelemek amaçlandı. Bu amaçla iki normal farelerden (kontrol), üçer tane de açlığın 6. ve 24. saatlerindeki farelerden alınan toplam sekiz karaciğer örneği kullanıldı. Elektron mikroskopik gözlemler, peritonitler hepatositlerde yapıldı. Kontrol grubunun hepatositleri çok sayıda mitokondriyum, iyi gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu (RER) ve bu organellerle sınırlanmış geniş glikojen alanları içeriyordu. Açlığın 6. saatindeki hepatositlerde organellerle sınırlanmış geniş glikojen alanları yerine, sitoplazmik organeller arasında yayılmış çok sayıda glikojen partikülleri gözlemlendi; RER tübülleri de yer yer ribozomlarını kaybetmiş ve genişlemişti. Açlığın 24. saatinde ise RER'in azaldığı ve tübüllerinin daha çok genişlediği, glikojen içeriğinin azaldığı, lizozomal yapıların ve serbest ribozomların arttığı, intramitokondriyal matriksin daha yoğun olduğu saptandı. Bu çalışmanın önemli bulgularından biri de, açlığın 24. saatindeki hepatositlerin sitoplazmasında az yoğunlukta materyal içeren, membranla kuşatılmış, düzensiz şekilli, iri yapıların gözlenmesiydi. Ayrıca bu hepatositlerin sinüzoidlere komşu plazma membranında, yine az yoğun materyal içeren küçük kesemsi yapılar izlendi.

Anahtar Kelimeler: Açlık, Hepatosit, Elektron mikroskopisi.  
Fare

T Klin Gastroenterohepatol 1999, 10:117-121

Geliş Tarihi: 11.02.1999

Yazışma Adresi: Dr.Elvan ÖZBEK  
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD  
25240 ERZURUM

\*• Bu çalışmanın bir bölümü, 8-11 Eylül 1998 tarihinde Diyarbakır'da yapılan 4. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

T Klin J Gastroenterohepatol 1999, 10

### Summary

In this study, the ultrastructural changes based on carbohydrate and lipid metabolisms in the hepatocytes of the mice fasted 6- and 24-hours (hr) were investigated. Total eight liver samples were obtained from two normal mice (controls), three of the 6- and 24-hr fasted mice. The hepatocytes of peripheral portion of the hepatic lobule were examined under the electron microscope. The data showed that the hepatocytes of the controls were including a number of mitochondria, well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) and large clumps of glycogen surrounded by these organelles. However, the hepatocytes of the mice fasted 6 hr were containing a lot of glycogen particles scattered among cytoplasmic organelles instead of large glycogen areas surrounded by organelles, in addition, it was observed that RER tubules sometimes lost their ribosomes and dilated. On the other hand, more dilated and decreased number of RER tubules, more depleted glycogen, well developed SER, more lysosomes and free ribosomes and denser intramitochondrial matrix were seen in the hepatocytes of the mice fasted 24 hr compared to the hepatocytes of the mice fasted 6 hr. The other important finding of this study, a few large structures which were electron-lucent, membrane bounded and irregularly shaped were determined in the cytoplasm of the hepatocytes from the mice fasted 24 hr: Furthermore, small invaginations including electron-lucent material were observed on the plasma membrane of the hepatocytes adjacent to sinusoids in this group.

Key Words: Starvation, Hepatocyte, Electron microscopy,  
Mouse

T Klin J Gastroenterohepatol 1999, 10:117-121

Hepatositler karbonhidrat ve lipid metabolizmasında iş gören hücrelerdir (1-4). Bu sebeple, beslenmeye bağlı olarak sitoplazmik organellerinde ve inklüzyonlarında değişimin beklenmesi doğaldır. Hepatositlerin glikojen metabolizmasındaki fonksiyonuyla ilgili çeşitli ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar yapılmıştır (5-7). Ancak bu hücrelerin lipid metabolizmasındaki göreviyle

bağlantılı olarak da, açlık süresince organellerinde ve paraplazmatik inklüzyonlarında değişim beklenmelidir. Bu çalışmada, açlığın 6. ve 24. saatlerinde, hepatositlerin lipid ve glikojen metabolizmasına dayalı ultrastrüktürünü, kontrol ile kıyaslayarak incelemek amaçlandı.

### Gereç ve Yöntem

Aynı şekilde beslenen erişkin fareler arasından 8 tanesi seçildi. Bunlardan 2'si kontrol olarak kullanılmak amacıyla hemen öldürüldü. Diğer 6 tanesi ayrı kafese alındı. Ayrılan fareler aç bırakıldı; ancak musluk suyu vermeye devam edildi. Bu farelerden 3'ü açlığın 6. saatinde, diğer 3'ü de açlığın 24. saatinde öldürüldü. Farelerin batin boşluğu açılarak her defasında karaciğerin aynı lobundan örnek alındı. Parçalar önce 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{P}_0_4$  +  $\text{NaHPCr}$ , tamponlu %3'lük gluteraldehitte, sonra 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{P}_0_4$  +  $\text{NaHPO}_4$  tamponlu %2'lük osmiumtetroksitte fikse edildi; asetonla dehidrate edilerek Araldite CY 212'de bloklandı. Kesitler LKB III ultramikrotom ile alındı. Yarı ince kesitlerde perilobüler hepatositler belirlendikten sonra, ince kesitleri elde edildi. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla boyandı, Jeol 100-SX elektron mikroskopunda incelenerek resimleri çekildi.

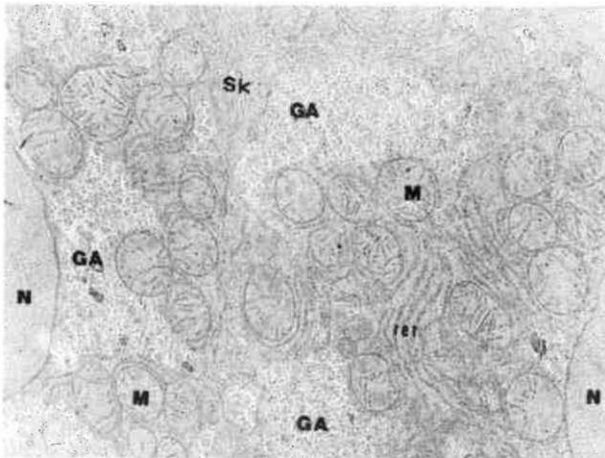
### Bulgular

Klasik karaciğer lobülünün periferinde ve sentralinde yer alan hepatositler arasında, beslenmeye

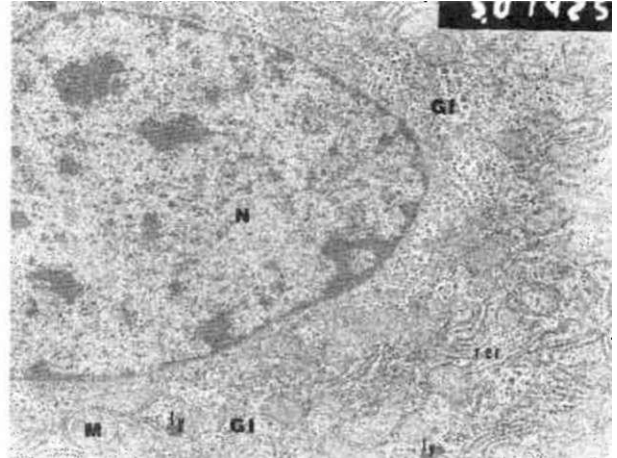
ilişkili olarak metabolik aktivite farklılığı bulunduğu; dolayısıyla, bu hepatositlerin sitoplazmik organeller ve inklüzyon bakımından da birbirinden farklılık gösterdiği çeşitli kaynaklarda bildirilmektedir (1,2,5). Buna göre kıyaslanmanın sağlıklı olabilmesi için, tüm deney gruplarındaki gözlemlerin belli bölgedeki hepatositler üzerinde yapılması gerektiği düşünüldü ve araştırma, perilobüler alandaki hepatositlerde yapıldı.

Kontrol grubuna ait hepatositlerin sitoplazmasında, genellikle yuvarlak şekilli çok sayıda mitokondriyon vardı. Mitokondriyonlarla yakın ilişkide olan, iyi gelişmiş, tübüleri ya da yassı keseleri sıkıca birbirine paralel düzenlenmiş RER gözlemlendi. RER ve mitokondriyonlarla kuşatılmış geniş glikojen alanları saptandı (Şekil 1).

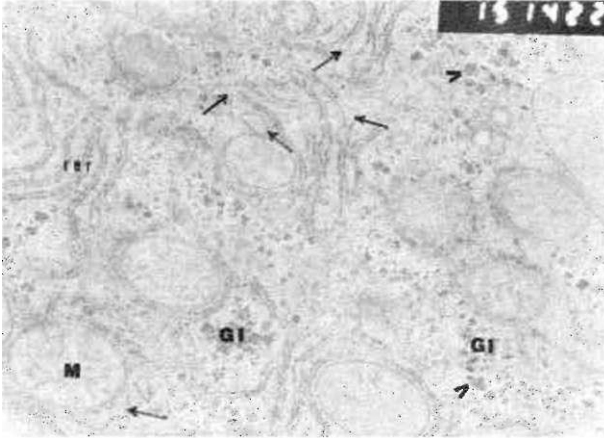
Açlığın 6. saatinde, hepatositlerde ilk bakışta dikkati çeken en büyük değişiklik, kontroldeki geniş glikojen alanlarının bulunmaması ve bunun yerine, sitoplazmik organeller arasında dağılmış çok sayıda glikojen partiküllerinin görülmesiydi. Bu hücrelerde yine iyi gelişmiş RER, sitoplazmada yaygın mitokondriyumlar izlendi ve yer yer lizozomal yapılarla rastlandı (Şekil 2). Büyük büyütmelerde, sitoplazmik organeller arasında dağılmış olan glikojen partiküllerinin çoğunlukla oc-tipinde olduğu ve RER tübüllerinin yer yer ribozomların kaybedip genişleyerek sitoplazmada ilerlediği gözlemlendi (Şekil 3).



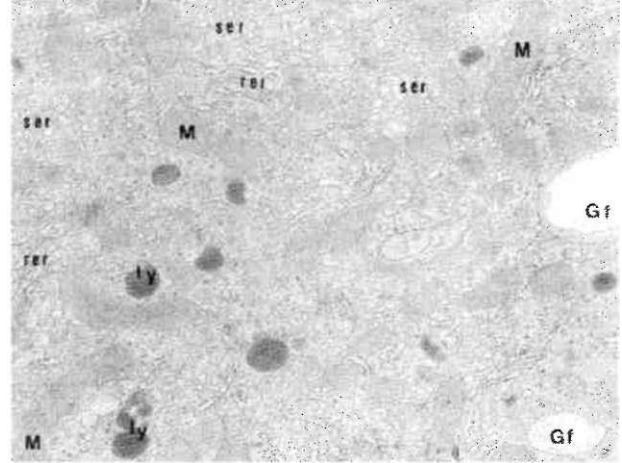
Şekil 1. Normal erişkin fare hepatositi. N, nükleüs; rer, granüllü endoplazma retikulumu; M, mitokondriyum; GA, glikojen alanları; Sk, safra kanallikülü. Uranil asetat, kurşun sitrat x6000



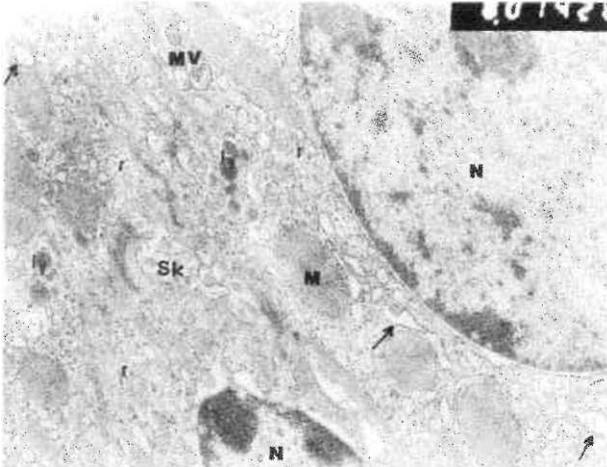
Şekil 2. Açlığın 6. saatinde fare hepatositi. N, nükleüs; rer, granüllü endoplazma retikulumu; M, mitokondriyum; GI, glikojen partikülleri; ly, lizozomlar. Uranil asetat, kurşun sitrat x5000



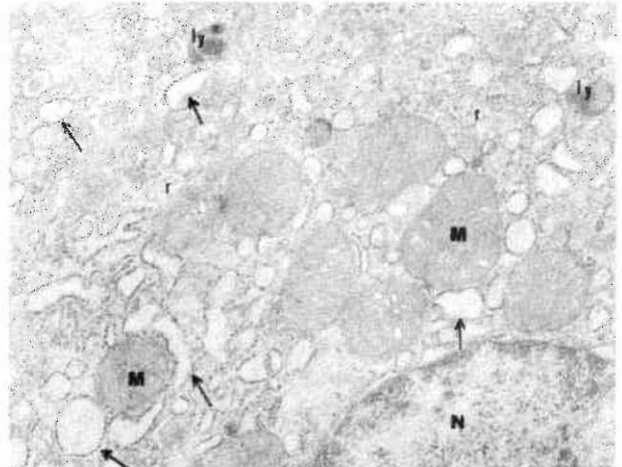
Şekil 3. Açlığın 6. saatinde fare hepatositi. rer, granüllü endoplazma retikulumu; ok, RER'in ribozomlarını kaybedip genişleyen bölümleri; M, mitokondrium; Gf, glikojen partikülleri; ok başı, a-partikülleri. L.Jranil asetat, kurşun sitrat x15000



Şekil 4. Açlığın 24. saatinde fare hepatositi. rer, granüllü endoplazma retikulumu; ser, granülsüz endoplazma retikulumu; M, mitokondrium; ly, lizozomlar; Gf, granülofilamentöz materyal içeren membranla sarılı iri oluşum. Uranil asetat, kurşun sitrat x6000



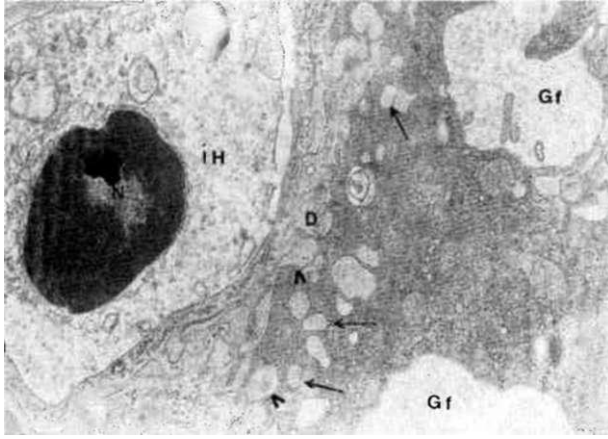
Şekil 5. Açlığın 24. saatinde fare hepatositi. N, nükleus; ok, genişlemiş ve yer yer ribozomlarını kaybetmiş RER; M, mitokondrium; ly, lizozomlar; Mv, multiveziküler cisim; Sk, safra kanalikülü; r, serbest ribozomlar. Uranil asetat, kurşun sitrat x 8 000



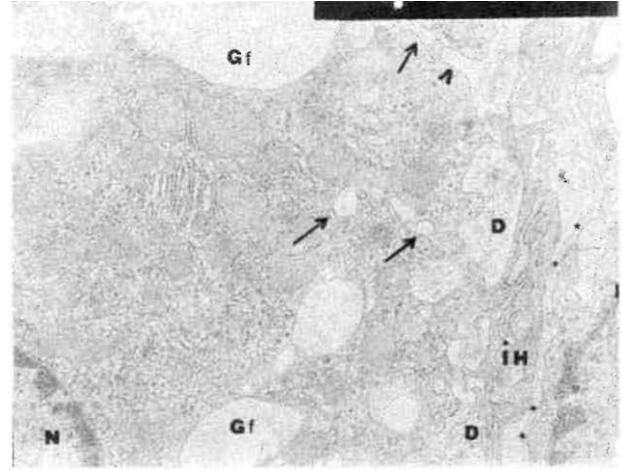
Şekil 6. Açlığın 24. saatinde fare hepatositi. N, nükleus; ok, genişlemiş ve yer yer ribozomlarını kaybetmiş RER; M, mitokondrium; ly, lizozomlar; r, serbest ribozomlar; Gf, granülofilamentöz materyal içeren membranla sarılı iri oluşum. Uranil asetat, kurşun sitrat x 8 000

Açlığın 24. saatinde, hepatositlerde SER'in RER'e oranla daha iyi gelişmiş olduğu görüldü (Şekil 4). Diğer gruplarda görülen aksine, RER tübüllerinin birbirine paralel düzeninin bozulduğu saptandı. Çoğu kere RER tübüllerinin genişlemiş olduğu ve ribozomlarını yer yer kaybettiği gözlemlendi (Şekil 5,6). Bu genişlemiş bölümler içinde az yoğun, granülofilamentöz. görünümde materyal bulunmaktaydı (Şekil 5). Sitoplazmada yine çok sayı-

da mitokondriyon vardı. Ancak intramitokondriyal-matriksin, diğer gruptakilere kıyasla daha fazla elektron yoğun olduğu görüldü (Şekil 4-6). Diğer bir belirgin değişiklik ise, açlık süresiyle paralel olarak artmış lizozomal yapıların izlenmesiydi (Şekil 4). Çok sayıda primer ve sekonder lizozomların yanı sıra iri multiveziküler cisimlere de rastlandı (Şekil 5). Glikojen içeriği ise, açlığın 24. saatindeki hepatositlerde belirgin olarak azalmıştı



Şekil 7. Açlığın 24. saatinde fare karaciğerine ait elektronmikrograf. D, Disse aralığı; İH, interstisiyel hücre (liposit); N, lipositin nükleusu; Gf, hepatositte granülofilamentöz materyal içeren iri oluşum; ok, hepatositin Disse aralığına bakan yüzündeki veziküller; ok başı, hepatositin plazma membranındaki keserisi yapılar. Uranil asetat, kurşun sitrat x8000



Şekil 8. Açlığın 24. saatinde fere karaciğerine ait elektronmikrograf. N, hepatosit nükleusu; D, Disse aralığı; İH, interstisiyel hücrenin sitoplazmik uzantısı; E, endotel hücresi; Gf, hepatositte granülofilamentöz materyal içeren iri oluşum; ok, hepatositin Disse aralığına bakan yüzündeki veziküller; ok başı, hepatositin plazma membranındaki keserisi yapılar; yıldız, endotel bazal membranı. Uranil asetat, kurşun sitrat x10000

(Şekil 4-6). Bu grupta görülen başka bir değişiklik de toparlak ya da düzensiz şekilli, membranla kuşatılmış, az yoğun ve granülofilamentöz görünümde materyal içeren, iri sitoplazmik yapıların bulunmasıydı (Şekil 4,6-8). Ayrıca bu hepatositlerin Disse aralığına bakan plazma membranında, endositozu ve/veya ekzositozu akla getiren, az yoğun materyalle dolu kesemsi yapılar (invaginasyonlar) vardı ve bu yapıların hemen altındaki sitoplazmik bölümde, yine az yoğun materyal içeren çok sayıda vezikül gözlemlendi (Şekil 7,8).

### Tartışma

Bu çalışmada, kontrol grubunda geniş glikojen alanları şeklinde gözlenen glikojen partiküllerinin, açlığın 6. saatinde sitoplazmik organeller arasında dağılmış olduğu, açlığın 24. saatinde ise belirgin olarak azaldığı saptandı. Beslenmeden sonra hepatosit sitoplazmasında a- ve (3-parikülleri şeklinde depolanan glikojenin, açlıkta kan glukoz seviyesinin düşmesini takiben, glukozu yıkılarak kan dolaşımına geçtiği (1-4) ve sitoplazmadaki miktarının, açlığın uzamasıyla beraber giderek azaldığı bilinmektedir (1-7). Glikojenoliz (glikojen yıkımı)'de iş gören glukoz-6-fosfataz enzimi, SER membranlarında yer alır (4). Bu nedenle glukoz yıkım bölgelerinde iyi gelişmiş SER görülmesi doğaldır.

Nitekim açlığın 24. saatinde SER'in oldukça iyi geliştiği görüldü. Ayrıca açlığın uzamasıyla birlikte RER tübüllerinin birbirine paralel düzeninin bozulduğu, açlığın 6. saatinden başlayıp giderek artan oranda RER tübüllerinin genişlediği ve duvarındaki ribozomlarını kaybettiği gözlemlendi. Açlıkta RER'deki bu değişiklik, Salaş M ve ark. tarafından da bulunmuştur (8). Kanımca RER, bu şekilde ribozomlarını kaybederek SER'e dönüşmektedir. Nitekim bu kanıda olan başka araştırmacılar da vardır (9). Açlıkta, lipolizin artmasıyla çevre yağ dokusundan periferik kana geçen yağ asidi miktarının ileri derecede yükseldiği (3) ve normalin 5-8 katına ulaştığı bildirilmektedir (4). Kan dolaşımıyla karaciğere gelen ve enerjiye çevrilmek üzere hepatositlere geçen yağ asitleri SER tübüllerinde taşınır (1-3). SER'in lipid metabolizmasında da iş gördüğü bilinmektedir (1-4). Yukarıda belirtildiği gibi açlıkta RER'in SER'e değiştiği düşünülürse, uzamış açlıkta endoplazma retikulumu tübüllerinin genişlemesi, hem glikojenoliz için yüzey artırma ihtiyacı hem de tümenlerinde yağ asitlerinin birikmesi nedeniyle olmalıdır. Nitekim açlığın 24. saatinde, geniş endoplazma retikulumu keseleri içinde az yoğun, granülofilamentöz bir materyalin biriktiği gözlemlendi. Serbest yağ asitlerinin, hepatositlere sinüzoidlerden geçtiği bilinir (3). Açlıkta kandaki miktarı artan yağ asitlerinin,

hepatositlere geçişinin de artması beklenir. Buna göre, açlığın 24. saatinde, hepatositlerin Disse aralığına bakan bölümlerindeki veziküller ve plazma mcmbranındaki kesemsi yapılar, kandan hepatosite doğru olan yağ asidi geçişinin yansıyan görünümüleri olabilir. Böylece, hepatosit sitoplazmasmdaki granülofilamentöz materyal içeren, iri yapılar da periferik kandan gelen yağ asitlerinin hücrede birikmesiyle oluşmuş olabilir. Ancak başka bir açıdan, sitoplazmadaki veziküller ve plazma mcmbranındaki kesemsi yapılar, hepatosite artmış bir ekzositozu da gösteriyor olabilir. Nitekim hepatosite sentezlendiği bilinen "düşük dansiteli serum lipoproteini" (VLDL)'nin (1,3,4) periferik kan düzeyinin açlıkta yükseldiği rapor edilmiştir (3). Dolayısıyla, uzamış açlıkta gözlenen veziküller, ekzositozla hepatositten kana verilecek olan lipoprotein partiküllerini de içeriyor olabilir. Lipoprotein partikülleri, SER membranlarında bulunan bir enzim aracılığıyla serbest yağ asitlerinden sentezlenir (3,4). Uzamış açlıkta, serbest yağ asitlerinin artmasına (3,4) ve SER'in iyi gelişmesine (5-7) bağlı olarak, lipoprotein sentezinin artmasını beklemek doğaldır. Buna göre, açlığın 24. saatindeki hepatositlerde gözlenen, toparlak ya da düzensiz şekilli, membranla sarılı, az yoğun, iri yapılar, sentezin artması sonucu hücrede biriken lipoprotein partiküllerini de içeriyor olabilir. Sonuçta, ister serbest yağ asidi isterse lipoprotein yapısında olsun, açlığın uzamasıyla hepatositin yağ içeriğinin arttığı söylenebilir. Nitekim açlıkta, hepatositlerde yağ içeriğinin artabileceğini bildiren başka kaynaklar da vardır (1,2). Langer M ve ark. ise açlıkta, canlı türüyle bağlantılı olarak, hepatositlerin yağ içeriğinde artış veya azalış gözlenebileceğini rapor etmişlerdir (10). Bundan başka, açlığın 24. saatinde intramitokondriyal matriksin, diğer iki gruptakine kıyasla daha elektron yoğun olduğu görüldü. Bilindiği gibi enerji ihtiyacını karşılamak üzere, hepatosite glikojenoliz ve yağ asitlerinin parçalanması sırasında, intramitokondriyal oksidatif fosforilasyon olayları hızlanır. Çünkü mitokondriyonda ADP'nin fosforilasyonu ile oluşturulan ATP, hücrede enerji kaynağı olarak kullanılır (3,4). Oksidatif fosfofilasyon sırasında, oksidasyona uğrayan maddelerden açığa çıkan hidrojen iyonlarının mitokondriyondan dışarı atılması, sitoplazmadaki kalsiyum gibi bazı katyonların mitokondriyon içine girmesi ile birlikte gerçekleşir (3). Kanımca açlığın uzamasıyla intramitokondriyal matriksin yoğunluk

kazanması, artan enerji ihtiyacını karşılamak üzere intramitokondriyal aktivitenin hızlanmasından ve beraberinde, buradaki katyon birikiminin daha da artmasından kaynaklanıyor olabilir. Açlığın 24. saatinde, hepatosit sitoplazmasmda bol miktarda serbest ribozomlara da rastlandı. Açlıkta RER'in yer yer ribozomlarını kaybetmesi sonucunda, sitoplazmada serbest ribozomların artması doğaldır. Bilindiği gibi serbest ribozomlar, hücre içinde kullanılacak proteinleri sentez eder (1,2). Buna göre, açlığın 24. saatinde bolca gözlenen serbest ribozomlar, açlığın uzamasıyla artmış hücre içi biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılmak üzere, çeşitli enzimleri sentez ediyor olabilir. Bu çalışmada ayrıca, hepatosit sitoplazmasmdaki lizozomal yapıların da açlık süresiyle paralel olarak arttığı gözlemlendi. Hücrede böyle metabolik aktivitenin arttığı durumlarda, lizozomal fonksiyonun artması doğaldır. Nitekim açlık sırasında hepatositlerde lizozomların arttığı, bazı araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (8,10,11). Böylece açlıkta hepatositlerde meydana gelen değişim sadece glikojen içeriğinde, RER ve SER'de değil, hücredeki enerji ihtiyacının, otofajik işlevin ve yağ oranının artmasıyla bağlantılı organel ve inklüzyonlarda da görüldü.

#### KAYNAKLAR

1. Fawcett DW, Bloom and Fawcett. A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman & Flail, 1994.
2. Kelly DE, Wood RL, Ender AC. Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy. 18 th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
3. Mentş G, Ersöz B. Harper'in Biyokimyası. İstanbul: Bans kitabevi, 1993.
4. Guyton AC. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 4 th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1987.
5. Gazilerli S. Karaciğer hücrelerinde glikojen yıkımı ve yapımına bağlı ışık ve elektron mikroskopik yapı değişimleri. Doçentlik tezi, Ankara Üniversitesi, 1977.
6. Robert R, Cardell RR Jr. Action of metabolic hormones on the fine structure of rat liver cells. I. Effects of Fasting on the ultrastructure of hepatocytes. Am J Anat, 1971; 131:21-54.
7. Babcock MB, Cardell RR Jr. Fine structure of hepatocytes from fasted and fed rats. Am J Anat, 1975; 143: 399-438.
8. Salaş M, Tuchveber B, Kourounakis P. Liver ultrastructure during acute stress. Pathol Res Pract, 1980; 167 (2-4): 217-33.
9. Vrensen JM, Kuyper MA. Involvement of rough endoplasmic reticulum and ribosomes in early stages of glycogen repletion in rat liver. J Microscopic, 1969; 8: 559-614.
10. Langer M, Storch V. Ultrastructure of hepatocytes in telcost fishes following food deprivation. Z Mikrosk Anat Forsch. 1978; 92 (4): 641-54.
11. Pokrovsky AA, Tashev TA, Krustev LP, Tutclyan VA, Kravchenko LV. Effect of long-term starvation on the rat liver lysosomes. hu J Vitam Nutr Res, 1976; 46 (1): 75-82.