

# Açlığın Karaciğer Glikojeni Üzerine Etkisinin Histokimyasal Olarak İncelenmesi

Şahin A. SIRMALI \*  
Şermin KALAYCI \*\*

## ÖZET

2, 6, 12, 24, 48 ve 72 saat aç bırakılan sıçanlarda karaciğer glikojen pattern'i tanımlandı. Açlık, hepatik lobülün periportal bölgesinde PAS pozitif reaksiyonu azalttı ve G6P az aktivitesini arttırdı ve nükleoplazma içinde dağılmış olan heterokromatin yoğunluğunun azalmasına da neden oldu.

## SUMMARY

### Histochemical Study of Effects of Fasting on the Hepatic Glycogen Patterns of Rats

*Hepatic glycogen patterns are described of rats fasted for period of 2,6,12,24, 48 or 72 hours. Fasting decreased in PAS positive reaction and increased in G6P ase activity in periportal region of hepatic lobules and also caused to decrease in concentration of heterochromatin which is distributed throughout the nucleoplasm.*

Memeli karaciğerindeki glikojen yapım ve yıkımının lobülün hangi zonunda başladığı konusunda tartışmalar ve yaygın görüş ayrılıkları bulunmaktadır. Kimi araştırmacılar, glikojen birikiminin ilk önce sentral zondan <sup>1-6</sup>, kimi araştırmacılar ise periferel zondan başladığını <sup>7-12</sup> belirtmişlerdir. Glikojen birikiminin ilk önce lobülün hangi zonundan başladığı tartışmalı olduğu gibi, glikojen kaçışının hangi zondan başladığı da tartışma konusudur. Kimi araştırmacılar kaçışın önce sentral zondan <sup>8.10.12</sup>, kimi ise periferel zondan başladığını <sup>1-6.9.11.13</sup> belirtmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, tartışmalı olan bu konunun hiç olmazsa bir bölümüne çözüm getirebilmek ve açlığın, hepatik lobüldeki glikojen niceliği ile yerleşim düzeni (pattern) üzerine etkisini araştırmaktır.

\* Biyolog Dr., U.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim-Dalı Araştırma Görevlisi

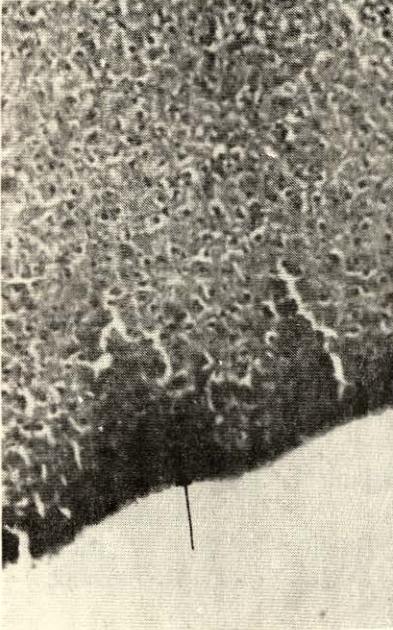
\*\* Prof. Dr., U.Ü. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Bölümü Öğretim Üyesi

## GEREÇ ve YÖNTEM

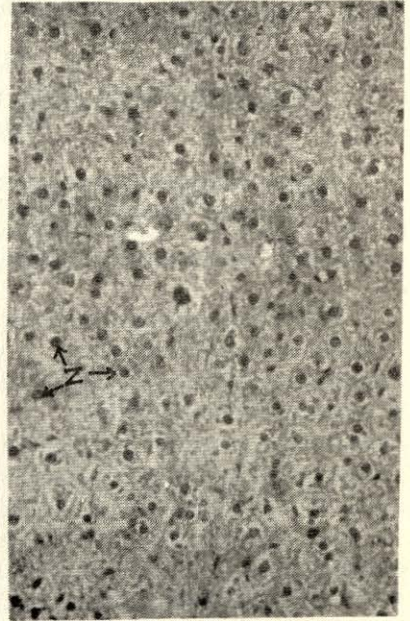
Ortalama ağırlıkları 280 gr. olan ve "Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi"nden sağlanan 60 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her biri 30 hayvan kapsayan deney ve kontrol gruplarına ayrıldı. Deney ve kontrol grupları, denemeye başlamadan önce bir hafta süreyle eşit şartlarda beslendi. Bu sürenin sonunda deney grubu açlığa terkedildi ve deney süresince bu hayvanlara su ve tuzdan başka hiç bir besin maddesi verilmedi. Kontrol grubu ise ad libitum beslendi. Açlığın 2., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerinde, deney ve kontrol gruplarından beşer hayvan deserebre edildi. Her hayvanın karaciğerinden alınan örneklerden birisi kuru buzda donduruldu ve kryostatda  $-18^{\circ}\text{C}$ 'da kesitler alındı. Bunlara Glikoz-6-fosfat (G6F az) boyaması yapıldı <sup>14</sup>. Diğer parçadan parafin blok hazırlandı ve alınan kesitler malt diastaz'la kontrollu olarak Peryodik asit Schiff (PAS) yöntemiyle boyandılar <sup>15</sup>.

## BULGULAR

*Açlığın 2. saatinde*, tüm boyamalarda kontrol ve deney gruplarında karaciğerin mikroskopik görünümü aynıydı. Bazı preparatlarda Glisson kapsülünün hemen altındaki hepatositlerde yoğun PAS pozitif boyanma gözlemlendi (Resim: 1). Bu preparatların bazılarında, kapsül altındaki PAS pozitif boyanan bölgelerde v. centralis'in



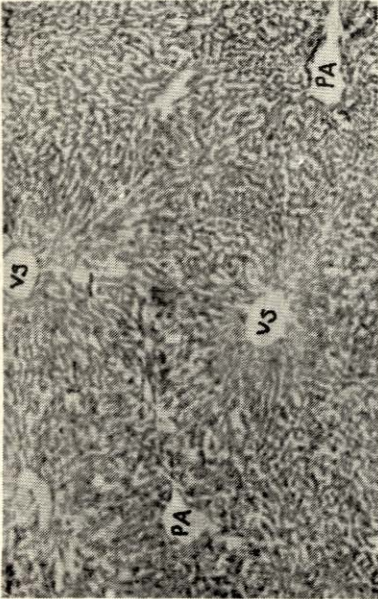
*Resim : 1*  
*Açlığın 2. Saatinde Glisson Kapsülü Altında Yoğun PAS Pozitif Boyanmış Hepatositler. PAS. 250x.*



*Resim : 2*  
*Malt Diastazla Kontrollu PAS. N; Hiperkromatik Çekirdek PAS. 400x.*

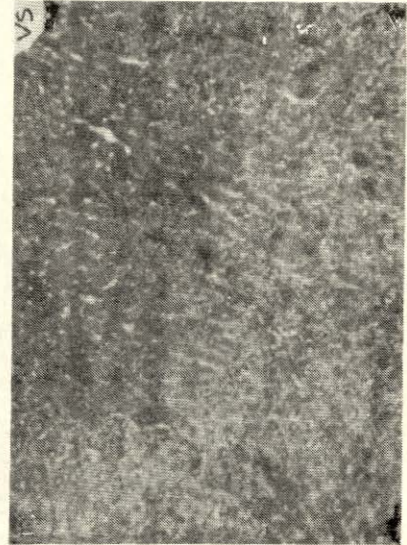
boyuna ve oblik kesitlerine rastlandı. Kontrol grubu sıçanlardan alınan kesitlerin malt diastaz'la kontrollü PAS boyamasında, hepatositlerin sitoplazmasında, tipik PAS pozitif boyanma görülmedi. Çekirdek hemen hemen üniform bazofil boyanmıştı ve sitoplazma da hafif bazofil boyalıydı (Resim: 2). G6F az boyamasında, bu enzimin etkinlik gösterdiği alanlar, tipik olarak koyu kahverengi ve siyah renkte görüldü. Perilobüler hepatositler yoğun pozitif boyanırken, bu yoğunluk midlobüler bölgenin periferindeki hücrelerde azalmaya başladı. Bu bölgenin orta bölümünde ve sentrilobüler bölgede tümüyle kayboldu (Resim: 3).

Açlığın 6. saati, deney grubunda tüm hepatik lobüllerdeki PAS pozitif boyanma azalmıştı. Sentrilobüler hepatositlerde yoğun PAS pozitif boyanma görülürken, perilobüler hepatositlerde PAS pozitif boyanma görülmedi. Lobül hemen hemen yarısına kadar glikojenini boşaltmıştı (Resim: 4). PAS pozitif boyanmış hücrelerin sitoplazmasında glikojen, çok küçük tanecikler şeklinde ve sitoplazmanın tümüne dağılmış bir görünümdeydi ve aralarında bazofil cisimler yer almıştı. Bu gruptaki sıçanların tümünün hepatik lobülünde glikojenin azaldığı görülmekle birlikte, hepsinin uyabileceği bir kalıp çizmek güçtü. Her lobülde glikojenin dağılım düzeni (Pattern'i) eşit görülmedi. Kiminde az, kiminde ise çok boşalma vardı. Lobülün glikojenini boşaltmış bölümünde (periportal alanda), çok seyrek olarak görülen PAS pozitif boyanmış hücre, her hayvanda eşit sayıda değildi. Bazı preparatlarda kapsül altında görülen PAS pozitif boyanmış hücrelerin sıralarının sayısı ve yerleşim şekli az da olsa değişiklik gösterdi.



Resim : 3

Açlığın 2. Saatinde, Perilobüler Hepatositlerde G6F Az Aktivasyonu. VS; v. Centralis, PA; Portal Aralık. G6F Az. 63x.



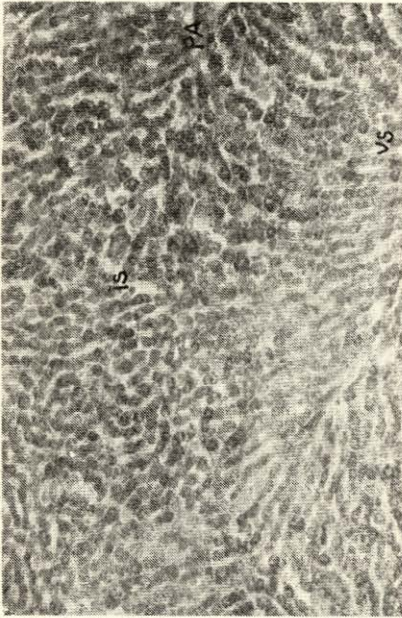
Resim : 4

Açlığın 6. Saatinde, Sentrilobüler Alanda Yoğun PAS Pozitif Boyanma. VS; v. Centralis. PAS. 250x.

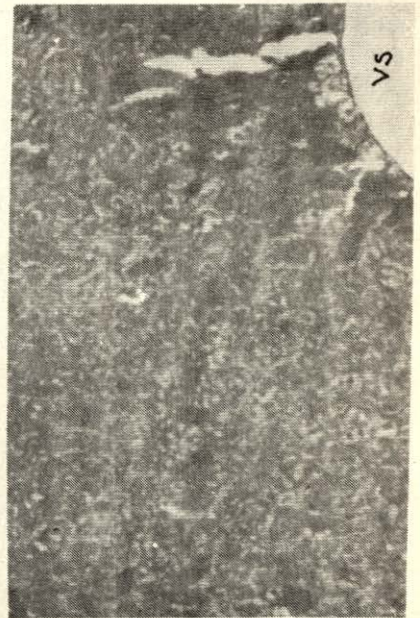
Perilobüler bölgede G6F az etkinliğinin artmış olduğu görüldü. Bu bölge yoğun pozitif boyanmıştı. Buradan v. centralis'e kadar olan bölge çok soluk (negatif) bir boyanma gösterdi (Resim: 5). Hepatosit sitoplazması içinde pozitif boyanan yerler çok küçük tanecikler şeklinde değil, geniş ve sınırlanmış alanlar durumundaydı. Kimi preparatlarda, portal aralığı çevreleyen 1-2 sıra hücrede daha yoğun pozitif boyanma görüldü.

Açlığın 12. saatinin belirgin özelliği, v.centralis çevresindeki dar bir şeridin PAS pozitif, diğer bölgelerin ise negatif boyanmasıydı. Tümüyle PAS negatif boyanmış midlobüler ve periportal hepatositler arasında, çok seyrek olarak pozitif boyalı hepatositlere de rastlandı (Resim: 6). Bu hepatositlerde pozitif boyanma küçük tanecikler şeklindeydi. G6F az aktivitesi lobülün tümüne yayılmıştı. Yalnızca sentrilobüler hepatositlerde negatif bir boyanma görüldü.

Açlığın 24., 48. ve 72. saatlerinde, her üç grupta da PAS pozitif boyanma hemen hemen görülmedi. Ancak çok seyrek olmak üzere, hepatic lobülün değişik zonlarında PAS pozitif boyanan hepatositlere rastlandı (Resim: 7). Glikojeni boşaltmış hepatositlerin sitoplazması açık bazofil boyanmıştı. Sitoplazmasında glikojen bulunan hepatositlerde olduğu gibi, yoğun bazofil boyanmış bölgelere rastlanmadı.

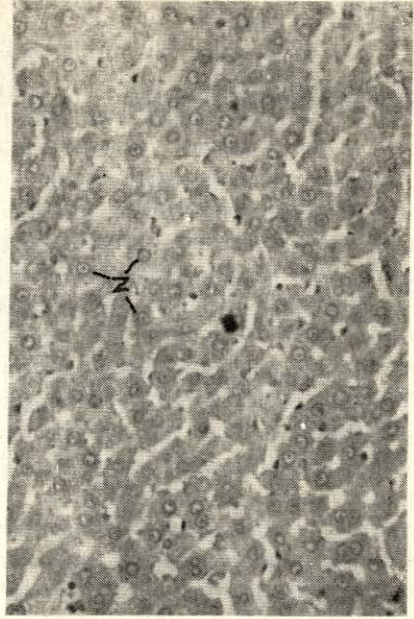


Resim : 5  
Açlığın 6. Saatinde, G6F Az Aktivasyonu. VS; v. Centralis, PA; Portal Aralık, İS; İnterlobüler Septum.  
G6F Az. 160x,



Resim : 6  
Açlığın 12. Saatinde, v. Centralis Etrafında Pozitif Boyanmış 3-4 Sıra Hepatosit. VS; v. Centralis.  
PAS. 250x.

Resim : 7  
48 Saat Aç Kalmış Sıçan Karaci-  
ğeri. N; Veziküler Tip Çekirdek.  
PAS. 400x.



Çekirdekte ise koyu bazofil boyanma kaybolmuştu. Bazı çekirdekler içinde bir ya da iki çekirdekçik belirgin olarak seçildi. Heterokromatin genellikle çekirdek membranının iç yüzüne birikmiş düzensiz, yoğun bazofil boyalı kümeler şeklinde gözlemlendi. Çekirdeğin bu görünümü tipik hipokromatik (veziküler) tipti. G6F az aktivitesi tüm kesitlerde artmıştı.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Elde edilen bulgular, araştırmacıların bir bölümünün bildirdiklerine uymakta <sup>1-6,9,11,13</sup>, bir bölümüne ise ters düşmektedir <sup>8,12</sup>.

Hepatik lobülde glikojen birikimi ve yapımına ilişkin ortaya çıkan sonuç ayrılıklarının nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

a- Araştırmacıların uyguladıkları araç ve yöntemlerindeki farklılıklar.

b- Eğer denemeye başlamadan önce hepatositteki glikojenin tümünün boşalması sağlanamamış ise (son beslenme zamanından başlayarak en az 30 saatlik bir süre geçmemiş ise) hücrede yeni glikojen oluşumları ile, eski glikojen kalıntıları birbirine karışabilir. Bu durum, erken glikojen birikim ile en çok glikojen birikimi sürelerinde farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir <sup>1,2,5</sup>.

c- Açlığa başlamadan önce, hayvanların beslenme yöntemlerinden doğan farklılıklar.

d- Bir deney grubunu oluşturan sıçanlar, oldukça farklı bir yapıya ve metabolizma yeteneğine sahip olabilirler. Bu durum gözönüne alınarak, çalışılan her hayvanın karaciğeri için hepatik glikojenin kimyasal olarak da sağlanması gerekir <sup>2,5</sup>. Hepatik lobül içindeki glikojenin dağılım düzeninin, histokimyasal olarak en az hatayla

saptanabilmesi için ise tüm karaciğerden seri kesitler alınıp bunların değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçlar verir <sup>10</sup>.

e- Hepatositin lobül içindeki yerleşimi kesin olarak bilinmelidir. Histolojik kesitin lobülden transvers, longitudinal ya da oblik geçip geçmediğine dikkat edilmeli ve hepatositin lobül içindeki yerleşimi buna göre değerlendirilmelidir <sup>1,4,5</sup>.

f- Bu farklılıklar, karaciğerde glikojen yapımı ve yıkımını uyaran etmenlerin niceliğine ve niteliğine bağlı olabilir.

g- Farklı görünümünün aslında yanlış gözlem olduğu da düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda, bu konuya ilişkin önemli bulgular vardır. Glikojen yapımı ya da yıkımı sırasında agranüler endoplazmik retikulum (AER) ile glikojen kümeleri (tanecikleri) nin birbirlerine göre değişen durumları ışık mikroskobunda farklı görünüme neden olabilir. Hepatositin ince yapısı ve hücre içi glikojenin yerleşik düzeni, önemli ölçüde AER'un niceliğine ve şekline bağlıdır. Sentrilobüler hepatositler, glikojen kümeleri arasında yayılmış (infiltrate), bol nicelikte AER içerirler. Bu da sitoplazmanın birim alanında az glikojen bulunmasına neden olur. Sonuçta, ışık mikroskobik olarak dağınık PAS pozitif boyanma görünümü ortaya çıkar. Buna zıt olarak periportal hepatositler, sentrilobüler hepatositlere oranla daha sıkı bir araya gelmiş glikojen kümeleri ve daha az AER içerirler ve AER glikojen kümelerinin içinde değil etrafında yerleşiktir. Bu da periportal hepatositler, sentrilobüler hepatositlere oranla daha yoğun PAS pozitif boyanmasına neden olur. Glikojen yıkımı sırasında, periportal hepatositlerdeki glikojen kümelerinin periferinden bir eksilme başlar. Sonuçta glikojen kümelerinin boyutlarında bir azalma olurken PAS pozitif boyanma yoğunluğunda çok az bir azalma görülür. Diğer yönden sentrilobüler hücrelerin glikojen kümelerinin aralarını doldurmuş olan AER'da belirgin bir çoğalma görülür. Böylece sentrilobüler hücrelerde, glikojen taneciklerinin kaçışı, kümenin içinden olur. Sonuçta glikojen kümelerinin boyutlarında çok az bir değişiklik olurken, ışık mikroskobik olarak PAS pozitif boyanma yoğunluğunda fazla bir azalma görülür. Elektron mikroskobik görüntüler üzerinde yapılan morfometrik ölçümler bu tip yanılgıları engellemektedir <sup>2,5</sup>.

Bu çalışmada gözlenen açlığa bağlı çekirdek ve sitoplazma değişimleri, endoplazmik retikulum (ER) un yapı ve işlevinde ortaya çıkan değişimlerle açıklanabilir. ER'un kimi etmenler karşısında yapısında ve işlevinde değişimler ortaya çıktığı, glikojen yapımı ve yıkımının da bu etmenlerden birisi olduğu bildirilmektedir <sup>2-8</sup>. Bu gibi durumlarda, granüler endoplazmik retikulum (GER)'un, AER'a dönüş tüğü, elektron mikroskobik çalışmalarda gözlenmiştir. Açlığın 2. saatinde hepatosit sitoplazmasında glikojen bol, AER az ve GER normal niceliktedir <sup>3</sup>. Işık mikroskobunda, sitoplazma içinde bazofil boyalı bölgeler olarak görülen bazofil cisimler, elektron mikroskobik olarak gözlenen GER ve serbest ribozomlardır <sup>8</sup>. GER'un sisternaları glikojen kümelerinin yakınında sonlanır. 15-21 saat açlıkta AER çoğalmaya başlar. Bu organelin tübülleri, GER'un sisternaları ile devam eder. Bu evrede GER'un membranında yerleşik ribozomlarda protein sentezi artar. Elde edilen protein GER'un sisternalarının uç bölümleri için yeni membran yapımında kullanılır. Böylece GER'un sisternalarının uçları, ribozomlarını yitirerek AER şeklinde glikojen kümeleri arasında yayılır. AER'un çoğalması sürdükçe glikojen azalır. Yeniden beslenmeyle glikojen yapımı sırasında ise glikojen çoğalırken AER azalır. Başka bir deyişle, glikojenin hem yapımı ve hem de yıkımı sırasında, glikojen ve AER niceliği arasında ters

bir orantı vardır<sup>1-5,8</sup>. AER'un çoğalmasına bağlı olarak, bu organelin tübüllerinde yer alan ve glikoneojenezin anahtar enzimlerinden biri olan G6F az aktivasyonunda da bir artma olduğu, G6F az boyamasıyla gösterildi. Böylece PAS pozitif boyanmayanla, G6F az pozitif boyanma arasında ters bir orantı olduğu görüldü ve taranan kaynaklarda aynı bulgulara rastlandı<sup>3,5,16</sup>.

## KAYNAKLAR

1. BABCOCK, M.B., CARDELL, R.R.: Hepatic Glycogen Patterns in Fasted and Fed Rats. *Am J Anat*, 140: p. 299-338, 1974.
2. BABCOCK, M.B., CARDELL, R.R.: Fine Structure of Hepatocytes from Fasted and Fed Rats. *Am J Anat* 143: p. 399-438, 1975.
3. CARDELL, R.R.: Action of Metabolic Hormones on the Fine Structure of Rat Liver Cells: I- Effects of Fasting on the Ultrastructure of Hepatocytes. *Am J Anat*, 131: p. 21-54, 1971.
4. CARDELL, R.R.: Action of Metabolic Hormones on the Fine Structure of Rat Liver Cells: III- Effects of Adrenalectomy and Administration of Cortisone. *Anat. Rec*, 180: p. 309-330, 1974.
5. CARDELL, R.R.: Smooth Endoplasmic Reticulum in Rat Hepatocytes During Glycogen Deposition and Depletion, *International Review of Cytology*, New York, Academic Press, 1977, p. 221-279.
6. GAZİLERLİ, S.: Karaciğer Hücrelerinde Glikojen Yıkımı ve Yapımına Bağlı Işık ve Elektron Mikroskopik Yapı Değişimleri, Doçentlik Tezi. AÜTF Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü, Ankara, 1977.
7. AREY, L.B.: Human Histology. A Textbook in Outline Form, 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1974, p. 235-240.
8. BLOMM, W., FAWCETT, D.W.: A Textbook of Histology, 10th ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975, p. 688-725.
9. GREEP, R.O.: Histology, 2nd ed. Mc Graw-Hill, 1966, p. 531-551.
10. KALAYCI, Ş.: Organoloji, Sindirim Sistemi Ders Notları, Bursa, Bursa Üniversitesi Basımevi, 1979, p. 315-328.
11. KAMINSKI, M., JONEK, J., KONECKI, J., KAMINSKA, O., GRUSZECZKA, B., KOEHLER, B.: Histochemical and Histoenzymatic Changes in Mouse Liver in Subacute Benzene Intoxication. *Acta Histochem.*, 61: p. 1-19, 1978.
12. LEESON, C.R., LEESON, T.S.: Histology. 3th ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1976, p. 376-390.
13. SASSE, D.: Dynamics of Liver Glycogen. The Topochemistry of Glycogen Synthesis, Glycogen content and Glycogoneolysis under the Experimental Conditions of Glycogen Accumulation and Depletion. *Histochem*, 45: p. 237-254, 1975.
14. RACE, G.S.: Laboratory Medicine. Hagerstown, Harper and Row, Vol. 3, Chap. 7 B, 1973, p. 14.

15. DRURY, R.A.B., WALLINGTON, E.A.: Carleton's Histological Technique. 4th ed. New York, Oxford University Press, 1967, p. 204-208.
16. ROSEN, S.I., KELLY, G.W., PETERS, V.B.: Glucose-6-Phosphatase in Tubular Endoplasmic Reticulum of Hepatocytes. Science, 152: p. 352-354, 1966.

Dr. Şahin A. SIRMALI, Ph. D.  
U.Ü. Tıp Fakültesi  
Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı  
BURSA