

Açlığın ince bağırsak mukozası üzerine olan etkilerinin ışık mikroskopik incelenmesi

Neriman ÇOLAKOĞLU*, Aysel KÜKNER**, Enver OZAN***

* F.Ü.T.F. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Bu çalışmada açlık ve açlık sonrası beslenmenin ince bağırsak ileum mukozasına olan etkileri incelendi. Çalışmada toplam 42 adet ergin erkek sıçan kullanıldı. Üç grup oluşturuldu. Birinci gruptaki hayvanlar 1, 2, 3, 5, 9, 11 ve 14 gün aç bırakıldı. İkinci gruptaki hayvanlar belli açlık sürelerini takiben doyurulup 1, 2, 3, 5 ve 12 gün sonra kesildi. Üçüncü gruptaki denekler kontrol olarak kullanıldı ve normal beslendi. Aç bırakılma süresince deneklere sadece su verildi. Denekler açlık süresi boyunca günlük olarak tartıldı. Deney süreleri sonunda eter anestezisi altında öldürülen deneklerin ileum bölgelerinden ışık mikroskopta incelemek üzere doku örnekleri alındı. Hazırlanan parafin kesitlere çeşitli boyalar uygulandı. Ayrıca villus uzunlukları oküler mikrometre ile ölçülerek değerlendirildi. Yapılan mikrometrik ölçümler sonucunda açlığın 3. gününden itibaren açlık süresinin artışına paralel olarak villus boylarında giderek kısalma gözlemlendi. Bunun yanında vücut ağırlıklarında azalma saptandı. Uzun süren açlık dönemlerinde (5, 9, 11 ve 14 gün) villusların lamina propriasındaki lenfatiklerde genişleme, kan damarlarında dolgunluk gözlemlendi. Paneth hücrelerinin ve içerdikleri granül yapılarının kontrol grubuna göre artmış olduğu tespit edildi. Açlık sonrası doyurulan gruplarda villus uzunluklarında uzama saptandı. Paneth hücrelerinin ve salgı granüllerinin yoğunlukları devam etmekteydi.

Anahtar Kelimeler: Açlık, İnce bağırsak, Paneth hücresi, Işık mikroskop

SUMMARY

Light microscopic observation of effects of starvation on intestinal mucosa.

The effects of starvation and refeeding on intestinal mucosa were studied in ileum of rat intestine. Forty-two adult male rats were used in this study. Animals were divided into three groups. First groups of twenty-one rats were starved for 1, 2, 3, 5, 9, 11 and 14 days. Second group of fifteen rats were refed after a period of starvation and then decapitated after 1, 2, 3, 5 and 12 days. Third groups of three rats were used as control animals. Starved rats were allowed to drink water ad libitum. Control animals had free access to water and to chow pellets until the time of killing. Animals were weighed daily during the fasting period. Animals were killed under ether anesthesia. Ileal sections were stained. Ileal villi size were measured by ocular micrometre. After 3-day fasting, villi height was observed to be gradually decreased with days of fasting. Body weight and after 3-day-fasting villi height gradually decreased with days of fasting. Lymphatics were dilated (5, 9, 11 and 14 day fasting), blood vessels were filled up with erythrocyte at the long term fasting (9, 11 and 14- day fasting). Paneth cells and their granules were gradually increased with days of fasting. Ileal villus were determined to height increased after refeeding. Paneth cells and their dense granules were persistent.

Key Words: Starvation, Small intestine, Paneth cell, Light microscopy

Açlığın mide-bağırsak sisteminde oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Açlık sırasında ornitin dekarboksilaz (1), timidin kinaz (1-3) ve mukozal DNA polimeraz (2) enzimlerinin etkileri azalmakta, hücre mitozu yavaşlamakta (4-6) ve bazı hücrelerin G1 ev-

resinde kalmasıyla hücre siklusunda uzama meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak epitel hücrelerinin yenilenmesi azalmaktadır (1,7). Açlıktan sonra beslenme ile birlikte bu enzimlerin aktivitelerinde (2,3) ve hücre mitozunda (4,6) artış mey-

dana gelmektedir. Aç bırakılan sıçanların ince bağırsak kriplerinde oldukça fazla sayıda apoptotik cisimlere rastlanırken, normal beslenen sıçanlarda bu cisimlere az miktarda rastlanmıştır (8).

SEM(Scanning elektron mikroskop) ve TEM (Transmission elektron mikroskop) ile yapılan incelemelerde açlığın ince bağırsak mukozal hücrelerinde dökülmelere sebep olduğu tespit edilmiştir (9). Yine açlık süresince kript hücre sayısında (7,10), madde emiliminde (9) ve ince bağırsak uzunluğunda (9,11) azalma saptanırken, Paneth hücre sayısında artış gözlenmiştir (12). Uzun süreli açlık durumunun ince bağırsak mukozasında atrofiye yol açtığı bildirilmektedir (13).

Bu çalışmada belirli günler aç bırakılan ve açlık sonrası doyurulan sıçanların ileum bölgesindeki yapısal değişiklikler, villus yapıları ve Paneth hücreleri incelenerek gözlenen değişikliklerin literatür bilgileri ile karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 240-250 gr olan 42 adet Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı.

1. Grup: 1, 2, 3, 5, 9, 11 ve 14 gün aç bırakılan grup (n:21)

2. Grup: 1, 2, 3 ve 5 gün açlıktan sonra aynı sürelerde doyurulan ve 14 gün açlıktan sonra 12 gün doyurulan grup (n:15)

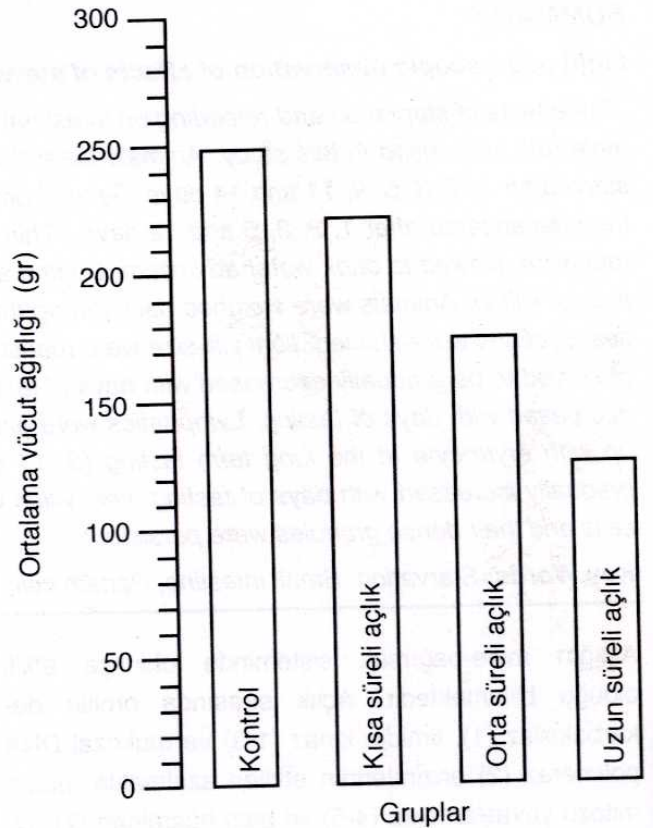
3. Grup: Normal beslenen kontrol grubu (n:6)

Aç bırakılan deneklere sadece su verildi. Kontrol grubu sıçanlar normal beslenmelerine devam etti. Aç bırakılan denekler günlük olarak tartıldı. Deney sonunda eter anestezisi altında öldürülen sıçanların ileum bölgesinden doku örnekleri alındı. Dokular fosfat tamponlu (pH:7.2) %2.5'lük glutaraldehit tespit solüsyonunda tespit edildikten sonra aynı tampon çözeltisi ile yıkandı. Dereceli etil alkol serilerinden geçirilip xylol'de parlatıldıktan sonra, parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5µm'lik kesitler alınıp, Hematoksilen-Eosin, Masson'un 3'lü boyası ve Periodic-acid Schiff boyaları uygulandı. Olympus BH2 fotomikroskobu ile incelenip, görüntülendi. Her grup için 80 villusun uzunluğu oküler mikrometre ile ölçüldü. Veriler istatistiksel olarak Varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Sonucu anlamlı bulunduğunda (P<0.05), ikincil çoklu karşılaştırma analizlerinden Tukey testi (Honestley Sinificant Dif-

ference test , HSD) ile gruplar arası farklar belirlendi. Açlığa bağlı ağırlık azalmasının kontrolü için açlık grubu kısa süreli açlık (1-5 gün, n: 5), orta süreli açlık (6-10 gün, n: 5) ve uzun süreli açlık (11-14 gün, n: 5) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Bütün veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verildi. Tekrarlı ölçümlerde tek faktörlü varyans analizi testi kullanılarak gruplar arasındaki kilo kaybı istatistiksel olarak incelendi. P<0.05 olduğunda fark anlamlı kabul edildi.

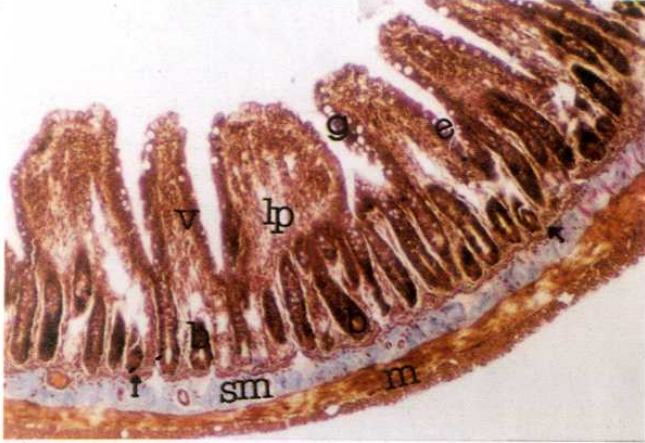
BULGULAR

Aç bırakılan deneklerden elde edilen veriler değerlendirildiğinde açlık süresinin artışına paralel olarak belirgin bir kilo kaybının meydana geldiği görüldü. Açlığın ilk gününde %6, üçüncü gününde %12, beşinci gününde %19, yedinci gününde %26, dokuzuncu gününde %34, onbirinci gününde %41 ve ondördüncü gününde ise %51'lik bir kilo kaybı saptandı. Ortalama canlı ağırlık; kısa süreli açlık döneminde (1-5 gün) 218±5.6gr (n:5), orta süreli açlık döneminde (6-10gün) 174±7.2gr (n:5) ve uzun süreli açlık döneminde (11-14gün) 135±4.0gr (n:5) olarak bulundu (Şekil 1). Kontrol grubu ile açlık grup-

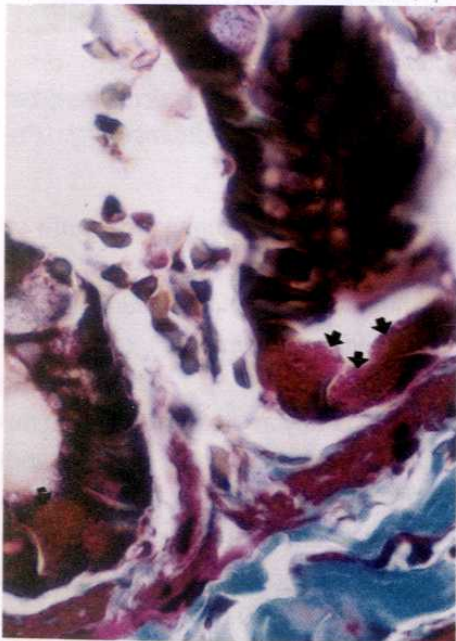


Şekil 1. Kontrol grubu ve aç gruplarının canlı ağırlıkları arasındaki ilişki gözlenmektedir.

ları kilo kaybı açısından karşılaştırıldığında; kontrol-kısa süreli açlık ($P<0.05$), kontrol-orta süreli açlık ($P<0.05$), kontrol-uzun süreli açlık ($P<0.05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulundu. Aç gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında; kısa süreli-orta süreli açlık ($P<0.05$), kısa süreli-uzun süreli açlık ($P<0.05$) ve orta süreli-uzun süreli açlık



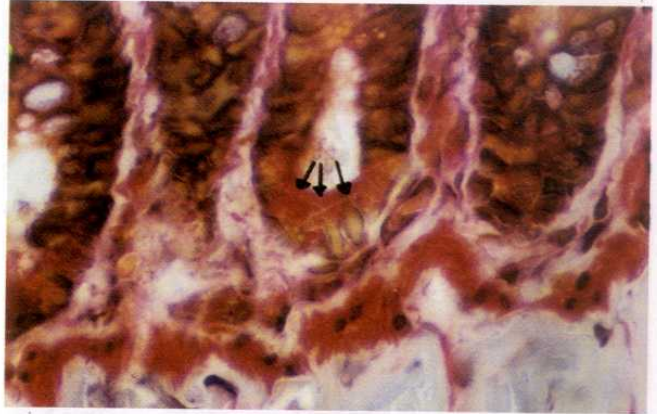
Şekil 2. Kontrol grubu sıçanların ileum yapısının ışık mikroskopik görünümü. Villus (VR), epitel hücresi (e), Goblet güresi (g), lamina propria (lp), intestinal bezler (b), lamina muskularis mukoza (oklar), submukoza (sm) ve kas tabakaları (m) ayırt edilmekte. Masson'un üçlü boyası x 10.



Şekil 4. Üç gün aç kalan grupta Paneth hücre granüllerinde artış izlenmekte (Oklar). Masson'un 3'lü boyası x 100

($P<0.05$) grupları arasında da vucut ağırlığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık tespit edildi.

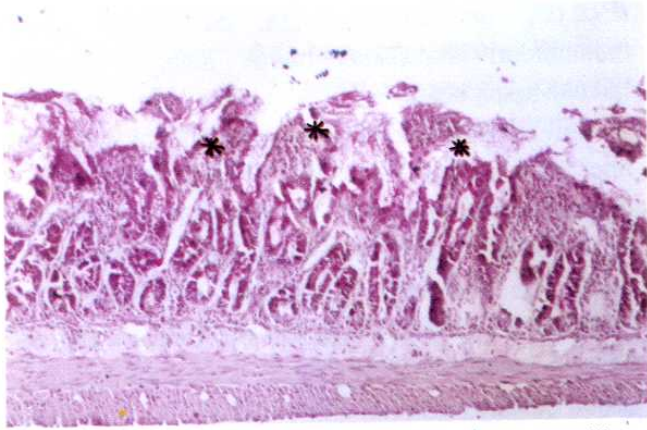
Işık mikroskopik olarak incelendiğinde, açlığın birinci ve ikinci gününde villus yapılarının ve Paneth hücrelerinin kontrol grubuna benzediği görüldü (Şekil 2, 3). Üç gün aç kalan grubun villus yapısı kontrol grubu ile benzerlik gösterirken, Paneth hücre granülleri yoğun olarak boyanmıştı (Şekil 4). Beş gün aç olan grubun villus yapısında lakteal genişlemeleri dikkat çekiciydi. Dokuz gün aç grupta ise genişleyen lakteallerde lenfositler saptandı, villus yapılarında bozulma gözlemlendi (Şekil 5). Paneth hücre yoğunluğu devam etmekteydi. Onbir gün aç gruptaki bulgular dokuz gün aç gruptaki bulgularla benzerlik



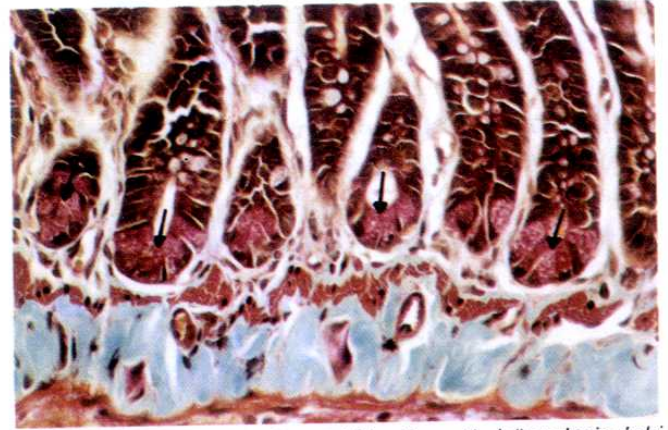
Şekil 3. Kontrol grubunda intestinal bezlerin tabanında yer alan, granüllü Paneth hücreleri (oklar) görülmekte. Masson'un 3'lü boyası x 10.



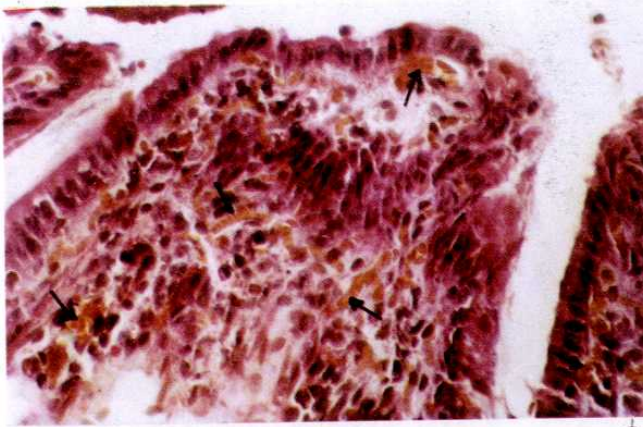
Şekil 5. Dokuz gün açlıkta deneklerin villus yapılarında bozulmalar (oklar) ve genişleyen lakteallerde lenfositler (çift ok) ayırt edilmekte. Küçük resim genişlemiş lakteallerin büyütülmüş halî. Periodic-acid Schiff x 10.



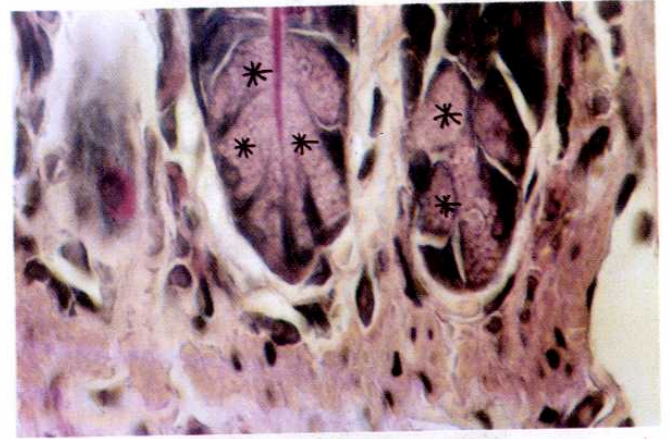
Şekil 6. On dört gün aç kalan sıçanların villus yapısındaki bozulmaların daha da şiddetlendiği görülmekte (*). Periodic-acid Schiff x 10.



Şekil 7. On dört gün açlıkta Paneth hücrelerindeki ve granüllerindeki yoğunlaşma ayırt edilmekte (oklar). (Masson'un üçlü boyası x 10.



Şekil 8. On dört gün açlıkta villusların kan damarlarındaki dolgunluk dikkat çekmekte (oklar). Masson'un üçlü boyası x 40.



Şekil 9. Beş günlük açlık sonrası beş gün doyuruluna deneklerin Paneth hücre granülleri oldukça yoğun olarak görülmekte(*). Periodic-acid Schiff x 100

göstermekteydi. Ondört gün aç grupta villuslardaki bozulma daha şiddetli idi (Şekil 6). Paneth hücrelerinde ve granüllerindeki yoğunluk daha fazla düzeyde görüldü (Şekil 7). Villuslardaki kan damarlarında dolgunluk dikkat çekmekteydi (Şekil 8).

Bir gün açlık sonrası bir gün doyurulan ve iki gün açlık sonrası iki gün doyurulan grupların Paneth hücreleri ve villus yapıları kontrol grubuna benzemektedir. Üç gün açlık sonrası üç gün doyurulan grubun villus yapısı kontrol grubuna benzerken Paneth hücre granüllerinde yoğunlaşma başlamıştı. Beş gün açlık sonrası beş gün doyurulan grubun villus yapısı düzgündü. Paneth hücre granülleri oldukça yoğun bir şekilde gözlemlendi (Şekil 9). Ondört gün açlık sonrası oniki gün doyurulan grubun villus yapısı kontrol grubu villuslarına benzemektedir (Şekil 10). Pa-

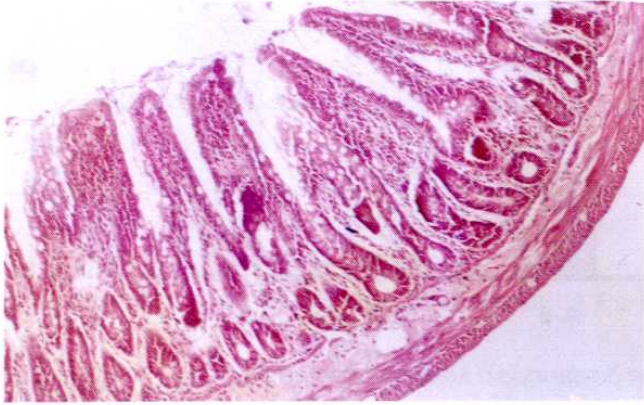
neth hücre granüllerindeki yoğunluk devam etmekteydi.

Yapılan mikrometrik ölçümler sonucunda, açlık süresine bağlı olarak villus boylarında kısalma saptandı. İstatistiksel analizlerde; 3, 5, 9, 11 ve 14 gün aç kalan deneklerin villus boyları ile kontrol grubu deneklerin villus boyları arasında anlamlı fark saptandı ($P<0.05$). Bir gün ile iki gün; beş gün ile dokuz gün ve 11gün ile 14 gün aç kalan deneklerin villus boyları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). Kısa süreli aç bırakılan (1 gün, 2 gün, 3 gün ve 5 gün) deneklerin villus boyları ile bu açlık sürelerinden sonra kısa süreli doyurulan (1 gün, 2 gün, 3 gün ve 5 gün) deneklerin villus boyları kendi aralarında

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($P>0.05$). On dört gün açlık sonunda oniki gün doyurulan deneklerin villus boyları kontrol grubuna yakın olarak bulundu (Tablo 1, Şekil 11, 12).

TARTIŞMA- SONUÇ

Buts ve arkadaşları 4 gün açlık sonunda ratların vücut ağırlığında %16-17 oranında bir düşüş gözlerken (14), Solomon 48 saat aç kalan sıçanların



Şekil 10. On dört gün açlıktan sonra on iki gün doyurulan sıçanların villus yapısındaki iyileşme izlenmekte. Hematoksilen - Eosin x 10.

kilosunda %25'lik bir düşüş saptamıştır (15). Bu çalışmada ise 2 gün açlık sonunda ratların vücut ağırlığında %10'luk bir düşüş saptanırken 4 gün açlık sonunda bu düşüş %16 idi. %25'lik kilo düşüşü açlığın 7. gününde saptandı. Açlığın 14. gününde kilo düşüşü %51 gibi çok şiddetli düzeyde idi.

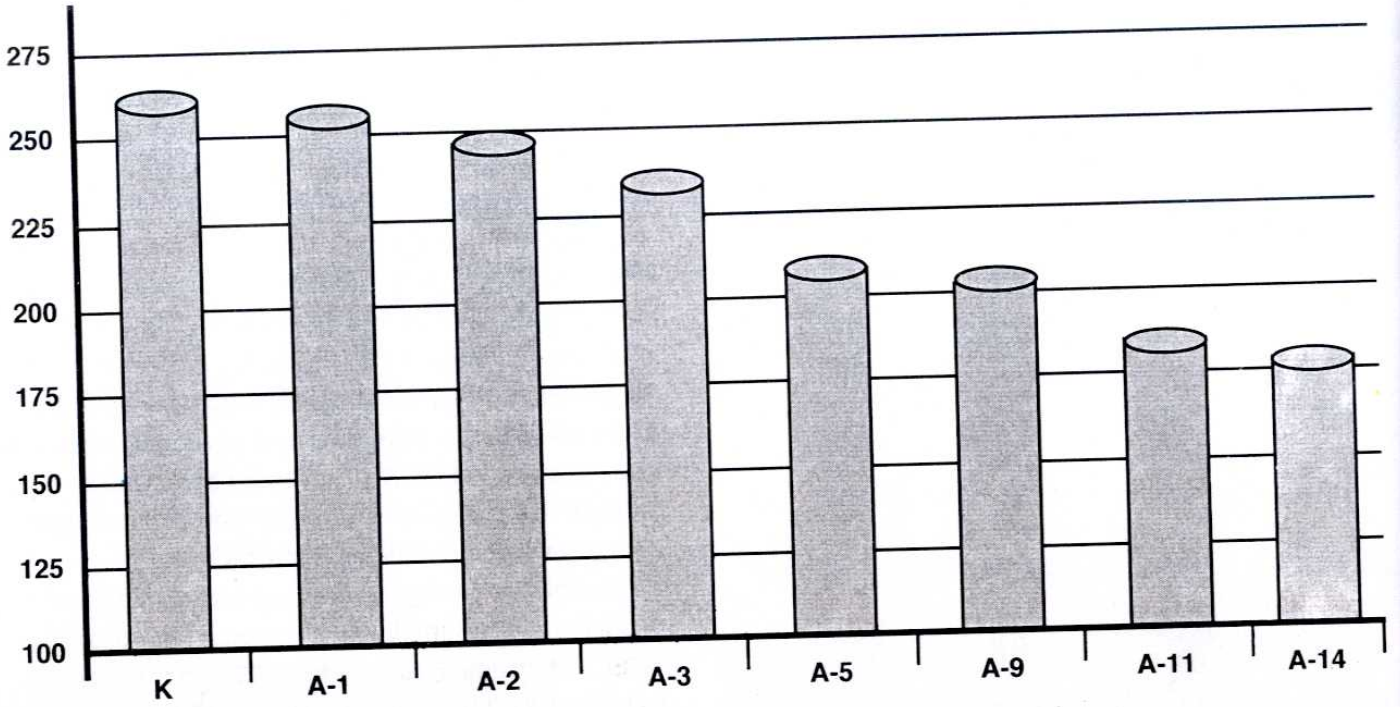
Oniki saat - yirmi gün arası değişen sürelerde açlığa maruz bırakılan deneklerin; duodenum villuslarında ilk 24 saatte kılma saptanırken, ileumun villus uzunluklarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Açlığın 36. saatinden sonra ise ince bağırsakların bütün villuslarında açlık süresinin artmasıyla birlikte kılma saptanmıştır. Açlıktan sonra beslenme ile duodenum kısa sürede iyileşirken, ileum daha uzun sürede yavaş bir şekilde iyileşmektedir (6).

Sıçanlarda yedi gün süren açlık deneyi sonunda duodenum villuslarında %40, jejunum villuslarında %35, üst ileum villuslarında %25, orta ileum villuslarında %21 ve terminal ileum villuslarında %14 oranında kılma gözlenmiştir. Açlık sonrası beslenme ile duodenum villuslarında %20, jejunum villuslarında %14'lük uzama saptanmıştır. İleum villus boyunda ise uzama tespit edilmemiştir (5). Clarke da

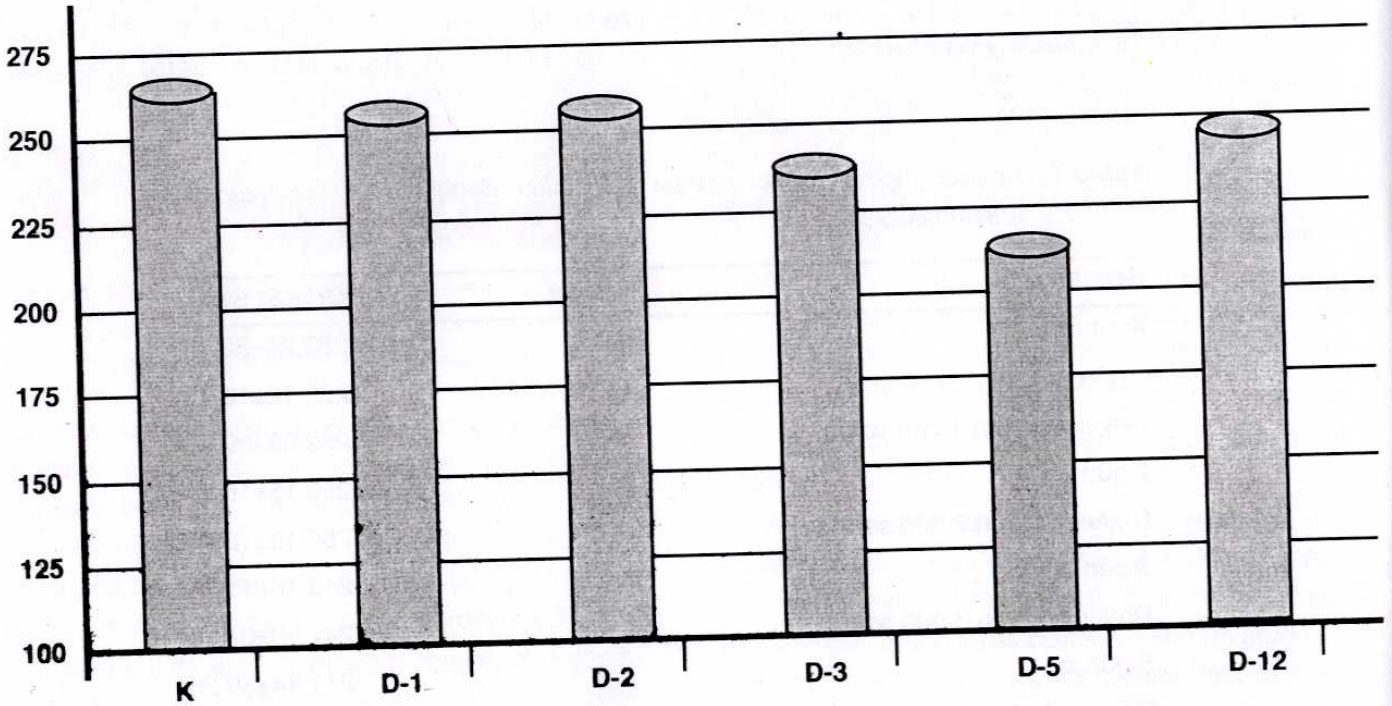
Tablo 1. Kontrol, aç ve açlık sonrası doyurulan deneklerin villus uzunlukları arasındaki ilişki.

Gruplar	Simge	Ort.±St.Sap.
Kontrol	K	262.24±30.74 ^a
1 gün aç	A-1	259.12±10.95 ^a
Doyurulduktan 1 gün sonra	D-1	259.68±09.49 ^a
2 gün aç	A-2	250.15±16.56 ^{ab}
Doyurulduktan 2 gün sonra	D-2	259.13±12.16 ^a
3 gün aç	A-3	240.16±11.74 ^b
Doyurulduktan 3 gün sonra	D-3	242.58±07.24 ^b
5 gün aç	A-5	211.84±30.25 ^c
Doyurulduktan 5 gün sonra	D-5	213.51±24.17 ^c
9 gün aç	A-9	208.03±07.52 ^c
11 gün aç	A-11	193.00±14.94 ^d
14 gün aç	A-14	188.37±27.77 ^d
Doyurulduktan 12 gün sonra	D-12	249.17±32.70 ^{ab}

Farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. ($P<0.05$).



Şekil 11. Açlık süresinin artışı ile villusların boylarındaki kısalma izlenmekte.



Şekil 12. Açlık sonrası doyurulma ile birlikte villusların boylarındaki uzama ayırt edilmekte.

yine açlık sonrası beslenme ile bağırsak villus uzunluğunda artış meydana geldiğini saptamıştır (16). Bu çalışmada ise ileum villuslarındaki kısalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında açlığın 3. gününden itibaren anlamlılık kazanmaktaydı. İleum villuslarındaki

kısalma üç gün açlık sonunda %8, beş gün açlık sonunda %19, dokuz gün açlık sonunda %20, onbir gün açlık sonunda %26 ve ondört gün açlık sonunda ise %28 idi. Açlıktan sonra beslenmenin etkisine bakıldığında, kısa süreli aç gruplarının villus boyları ile

kısa süreli doyurulmuş grupların villus boyları arasında önemli bir fark gözlenmedi. Fakat ondört gün açlık süresini takiben oniki gün doyurulan deneklerin villus boylarında %32'lik bir uzama saptandı.

Üç gün aç kalan sıçanların jejunum mukozasında atrofi saptanırken, ileum mukozasında morfometrik bir değişiklik gözlenmemiştir (17). Bu çalışmada da özellikle uzun süren açlık dönemlerinde (9, 11 ve 14 gün) villus yapılarında bozulmalar, dolgun kan damarları ve içlerinde lenfositlerin belirgin olarak görüldüğü oldukça genişlemiş lakteal kanallar gözlenmekteydi. Buna karşı grupların hiçbirinde mukozal atrofi gözlenmedi. Goblet hücreleri ve enterositlerde bir bozulma tespit edilmedi.

Üç gün aç kalan sıçanlarda Paneth hücreleri kontrol grubuna benzerlik gösterirken açlığın 4. gününden sonra her üç bağırsak bölgesinde de Pa-

neth hücrelerinin sayısında artış saptanmıştır (12). Bu çalışmada da aç ve açlık sonrası doyurulan grupların Paneth hücrelerinde artış ve Paneth hücre granüllerindeki yoğunluk kontrol grubu ile karşılaştırılınca açık bir şekilde gözlemlendi.

Bu çalışmada kısa ve uzun süreli aç bırakılan ve açlık sonrası doyurulan sıçanların ince bağırsak yapılarındaki değişiklikler ışık mikroskopik olarak incelendi. Özellikle Paneth hücrelerinin granül içeriklerinin açlık ile birlikte yoğunlaştığı ve açlık sonrası doyurulan gruplarda bu yoğunluğun devam ettiği görüldü. Bu konuda yapılacak olan immünohistokimyasal çalışmalar granüllerin içeriği hakkında daha detaylı bilgi sağlayacaktır. Açlık gününün artışıyla orantılı olarak villus uzunluklarında azalma olduğu doyurulma ile villus uzunluklarının hemen hemen kontrol değerlere ulaştığı gözlemlendi.

KAYNAKLAR

1. Chwalinski S, Potten CS. Crypt base columnar cells in ileum of BDF1 male mice. Their numbers and some features of their proliferation. *Am J Anat* 1989;186:397-406.
2. Majumdar AP. Regulation of gastric mucosal DNA synthesis during fasting and refeeding in rats. *Digestion* 1983; 27(1): 36-43.
3. Holt PR, Wu S, Yeh KY. Ileal hyperplastic response to starvation in the rat. *Am J Physiol* 1986; 251(1 Pt 1): G 124-31.
4. Aldewachi HS, Wright NA, Appleton DR, Watson JA. The effect of starvation and refeeding on cell population kinetics in the rat small bowel mucosa. *J Anat* 1975; 119: 1: 105-21.
5. Altman GG. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am J Anat* 1972; 133: 391-400
6. Yamauchi K, Kamisoyama H, Isshiki Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hense. *Br Poult Sci* 1996;37(5):909-21.
7. Hagemann RF, Stragand JJ. Fasting and refeeding : Cell kinetic response of jejunum, ileum and colon. *Cell Tissue Kinet* 1977; 10 :3-14 .
8. Elmes ME. Apoptosis in the small intestine of zinc-deficient and fasted rats . *J Pathol* 1977 ; 123 (4) : 219 – 23 .
9. Bayer RC , Rittenburg JH, Bird FH, Chawan CB, Allen M . Influence of short term fasting on chicken alimentary canal mucosa. *Poult Sci* 1981; 60(6): 1293-302 .
10. Goodlad RA, Plumb JA, Wright NA. Epithelial cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the rat . *Clin Sci* 1988; 74(3): 301-6.
11. Levin RJ, Mitchell MA. Problems involved in correlating changes of functional diffusive and anatomical surface areas of the upper and lower chicken small intestine during fasting. *Br Poult Sci* 1984; 25 (1): 27-31.
12. Elmes ME. The Paneth cell population of the small intestine of rat – Effects of fasting and zinc deficiency on total count and on dithizone – reactive count. *J Pathol* 1976 ; 118 : 183-191.
13. Ulshen HM, Ralph H. Luminal epidermal growth factor preserves mucosal mass of small bowel in fasting rats. *Clin Sci* 1996; 90: 427-31.
14. Buts JP, Vijverman V, Barudi C, Keyser De N, Mالدague P, Dive C. Refeeding after starvation in the rat: Comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *Eur J Clin Invest* 1990;20:441-52 .
15. Solomon ET. Trophic effects of pentagastrin on gastrointestinal tract in fed and fasted rats. *Gastroenterology* 1986; 91: 108-16 .
16. Clarke RM. The time-course of changes in mucosal architecture and epithelial cell production and cell shedding in the small intestine of the rat fed after fasting. *J Anat* 1975; 120 (2) : 321- 7 .
17. Gorostiza E, Poullain MG, Marche C, Gobert JG, Bro-yart JP, Macry J, Cezard JP. Effect of fasting and refeeding on the adaptation of the small intestine in rats. A model for physiopathologic studies. *Gastroenterol Clin Biol* 1985 ; 9(11) : 790-6 .