

BÖBREK KORTEKSİNDE TUBULUS PROKSİMALİS HÜCRELERİNİN İNTRAMİTOKONDRIYAL GRANÜLALARI HAKKINDA ULTRASTRÜKTÜRAL VE SİTOKİMYASAL İNCELEME

Dr. Aliye ERKOÇAK (*)

GİRİŞ

Elektron mikroskopla mitokondriyaların matriksi içinde elektronlara karşı yoğun granülalar görülür (intramitokondriyal granülalar). İntramitokondriyal granülaların yapısal ve fonksiyonel nitelikleri henüz tartışma konusudur. Bunların hücre içine iyon iletimi ile ilişkili olduğu (11, 6) veya üzerlerine bazı iyonların oturup biriktiği (2, 4), yapılarının esas itibarıyla nötral lipidlerden meydana geldiği (8), fosfolipid olduğu (12) ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada böbrek korteksi proksimal tubulusunun intramitokondriyal granülalarının yapısı ve bazı katyonların biriktirilmesi veya iletimi ile ilişkisi sitokimyasal bir yaklaşımla elektron mikroskopik düzeyde incelendi. Bu amaçla 1 - Lipid içeriğin tanınması, 2 - Nükleik asitlerin enzimatik hidrolizi, 3 - Bazı katyonların uzaklaştırılması, 4 - İki değerli bazı katyonların sokulması deneyleri yapıldı.

MATERYEL VE YÖNTEM

Materyal 200 - 350 gr. ağırlığındaki kobaylardan elde edilen böbrek korteksi parçalarıdır.

Materyelin birinci bölümü, vücuttan ayrıldıktan hemen sonra fikzator içinde küçük parçalara ayrıldı. Bunların bir kısmı, fosfat tampon ile pH 7,4 yapılmış % 3,5 glutaraldehit içinde 1

(*) A. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji Kürsüsü Profesörü

saat tesbit edildi. Diğerleri, aynı glutaraldehit fikzatorü içinde 20 dakikalık bir ön tesbitten sonra veronal -asetat tampon ile pH 7,4 yapılmış % 2 osmium tetroksit içinde 45 dakikalık arka fikzasyona bırakıldı. Hem tek başına glutaraldehit hem de glutaraldehit - osmium tetroksit ile tesbit edilen parçaların enklüzyonu vestopal W ile yapıldı. Bu bloklardan hazırlanan 200 - 400 Angström kalınlığındaki ultra ince kesitlerin bir kısmı oda ısısında 1 saat % 7 hidrojen peroksit üzerinde yüzmeye bırakıldı. Tüm kesitlerin boyanması (kontrast yapmak) uranil asetat ile sağlandı.

Materyelin ikinci bölümü, hayvandan ayrıldıktan hemen sonra kriyostat ile -18° de 40 mikron kalınlığında kesildi. Bu kalın kriyostat kesitleri fosfat tampon ile pH 7,4 yapılmış % 3,5 glutaraldehit içinde 25 dakika ön tesbite bırakıldı ve pH ları 7,4 olan soğuk fosfat ve veronal -asetat tamponların her birinde dörder defa değiştirmek suretiyle yıkandıktan sonra, osmium tetroksit ile tesbite geçmeden evvel aşağıda belirtilen sekiz ayrı işleme uğratıldı.

- 1 — % 96 etanol içinde 4° de 4 saat bırakma.
- 2 — Saf aseton içinde 4° de 4 saat bırakma.
- 3 — Veronal -asetat tampon içinde bir santimetre küpde 1 mgr. ribonükleaz içeren, pH 6,8 ortamda, 37° de, 1 saat süre ile enkübasyon.
- 4 — Veronal -asetat tampon içinde bir santimetre küpde 1 mgr. dezoksiribonükleaz içeren, pH 6,8 ortamda, 37° de, 1 saat süre ile enkübasyon.
- 5 — Veronal -asetat tampon içinde 0,1 M etilen diamin tetra asetik asit içeren, pH 7,4 ortamda, 35° de, 45 dakika süre ile enkübasyon.
- 6 — Veronal -asetat tampon içinde final konsantrasyon olarak 10 mM kalsiyum asetat içeren, pH 7,4 ortamda, 35° de, 6 saat enkübasyon. Enkübasyon süresince ortam yarım saatte bir yenilendi.
- 7 — Veronal -asetat tampon içinde final konsantrasyon olarak 10 mM baryum klörür içeren, pH 7,4 ortamda, 35°

de, 6 saat enkübasyon. Ortam yarım saatte bir yenilendi.

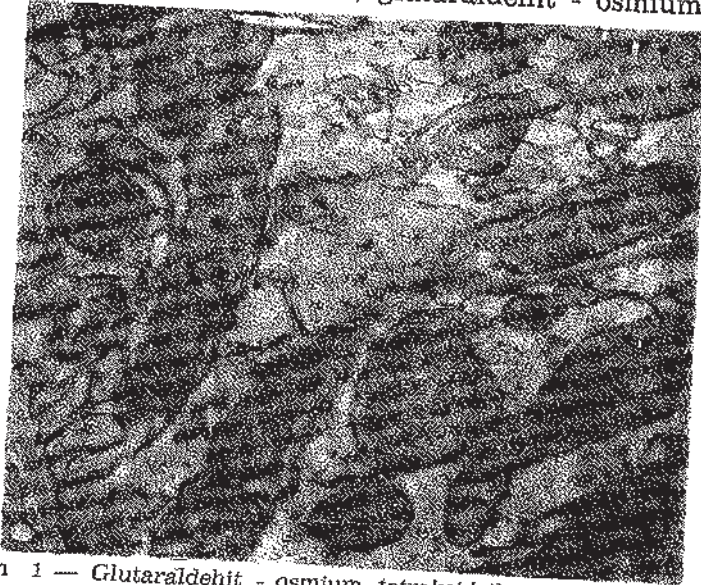
8— Kontrol: pH 7,4 olan veronal - asetat tamponda enkübasyon.

Bu işlemlere uğratılan tüm kriyostat kesitleri veronal - asetat tamponda yıkanıp yine veronal - asetat tampon ile pH 7,4 yapılmış % 2 osmium tetroksid içinde 30 dakika arka fikzasyona bırakıldı. Enklüzyon vestopal W ile yapıldı ve 200 - 400 Agström kalınlığında ultra ince kesitler uranil asetat ile boyandı.

Materyelin üçüncü bölümü, öldürmeden evvel 7 - 10 gün süre ile günde 4 - 5 defa 10 mgr./Kg. dozunda desferral enjeksiyonu yapılmış kobaylara aittir. Bunlar glutaraldehit - osmium tetroksit ile tesbit edilip vestopal W ile enklüzyon yapıldı.

BULGULAR

Böbrek korteksinde tubulus proksimalis epitel hücrelerinin intramitokondriyal granülları, glutaraldehit - osmium tetrok-



Resim 1 — Glutaraldehit - osmium tetroksid ile tesbit edilmiş böbrek korteksi. Tubulus proksimalisin bir epitel hücresinin bazal sitoplazmasında iri mitokondriyalar içinde değişik sayı ve büyüklükte yoğun intramitokondriyal granülalar görülüyor. X 25000.

sid ile tesbitten sonra, toparlağımsı bazan hafifçe düzensiz biçimde ve farklı büyüklükde görülürler. Çapları 250 - 500 Angström arasında değişir. Bir mitokondriya kesitinde 1 - 4 adet rastlanabilirler (Resim 1), fakat bazan daha fazla bulundukları da olur. Yapıları çok kuvvetli büyültme ile homojen değil, ince granüler görünüştedir. Çoğu kez elektronlara karşı tamamiyle yoğunurlar. Fakat bazan periferik veya orta kısımları granülerin geri kalanına göre daha az yoğun olarak açık renk olabilir.

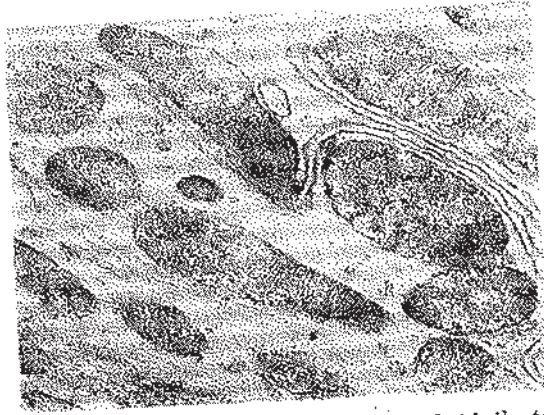
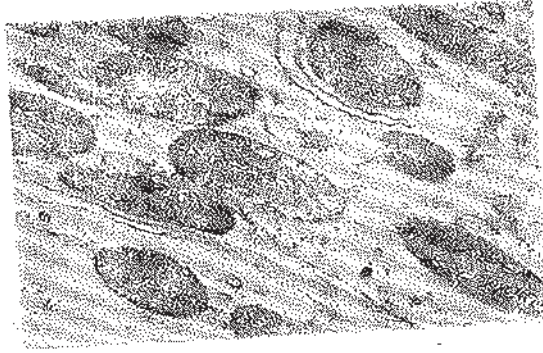
Sadece glutaraldehit ile tesbit edilmiş materyelde intramitokondriyal granülalar ancak nadiren küçük ve az yoğun olarak açık renk görülebilirler (Resim 2). Şu halde bunların os-



Resim 2 — Tek başına glutaraldehit ile tesbit edilmiş böbrek korteksi. Tubulus proksimalisin bir epitel hücresinin bazal sitoplazmasında mitokondriyalar. İntrasitoplazmik membranlar ile mitokondriya membranları fikzator içinde osmium tetroksid bulunmadığından beyaz görülüyor. Bu çift membranların iki yaprağı arasındaki az yoğun madde, bunların beyaz görünen sınır membranları ile kontrast yaparak koyu bir çizgi gibi belirgin. Tam ortadaki bir mitokondriyada az yoğun açık renk bir intramitokondriyal granüle mevcut. Diğer mitokondriyalar bu granülalardan yoksun. X 25000.

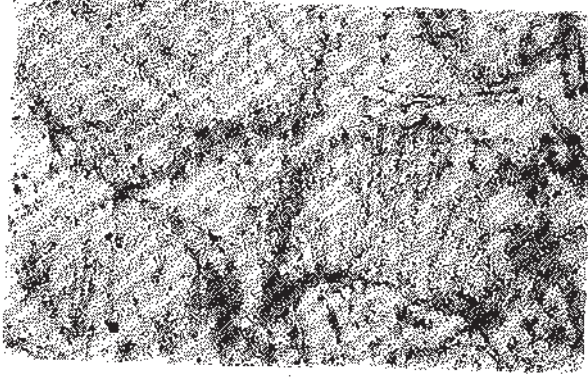
mium tetroksid ile tesbitten sonra çok sayıda iri ve yoğun görülmeleri kuvvetli osmiyofil olmalarından ileri gelir.

Hidrojen peroksit ile işlemten sonra, tek başına glutaraldehit tesbiti yapılmış kesitlerde değişiklik bulunmadığı halde, glutaraldehit - osmium tetroksid ile tesbit edilmiş kesitlerde intramitokondriyal granülalar çoğunlukla yerlerinde beyaz delikler bırakarak kaybolurlar (Resim 3 ve 4).



Resim 3 ve 4 — Glutaraldehit - osmium tetroksid ile tesbit edilmiş ve H_2O_2 ile işlem yapılmış böbrek korteksi kesiti. Tubulus proksimalise ait bir epitel hücrenin intrasitoplazmik membranlarla sınırlanmış bazal sitoplazma kompartımanlarında yerleşmiş uzun mitokondriyalar içindeki intramitokondriyal granülaların kayboldukları ve yerlerinde beyaz delikler bırakıldıkları görülüyor. X 22000.

% 98 lik etanol ile ekstraksiyondan sonra intramitokondriyal granülalar görülmezler (Resim 5). Saf aseton ile işlem-



Resim 5 --- Etanol ekstraksiyonu yapılmış mitokondriya. İntramitokondriyal granülalar görülmüyor. X 30000.

den sonra ise biraz daha küçük ve az yoğun olmakla beraber osmium tetroksit ile yine reaksiyon verirler.

Ribonükleaz ve dezoksiribonükleaz enzimlerinin etkisine bırakılan materyelde intramitokondriyal granülalar değişmezlik sayı, büyüklük ve yapı itibarıyla kontrol materyelinde gözlenen normal durumlarını korurlar.

Bazı katyonların hücreye sokulması deneylerine göre, içine kalsiyum asetat katılmış ortamda enkübasyona bırakılan materyele ilişkin kesitlerde intramitokondriyal granülalar sayı ve büyüklük itibarıyla artarlar. Çapları 500 - 1000 Angström'e ulaşır, granüla içeren, özellikle ikiden fazla granüla içeren mitokondriyalara daha sık rastlanır (Resim 6). Hatta yoğun granüla kümesi içeren mitokondriyalar da mevcuttur. Bu sonuçlarda, yoğun granülaların kümelenmesi yanında krista mitokondriyalisler genişlemiş, mitokondriya matriksi ise, az yoğun duruma gelmiştir. İntramitokondriyal granülalar genel olarak daha yoğundur. Kuvvetli büyütme ile açık renk bir zemin üzerinde daha koyu ufak taneciklerin paralel veya radyer dizilmesi suretiyle lameller bir yapı gösterirler (Resim 7).

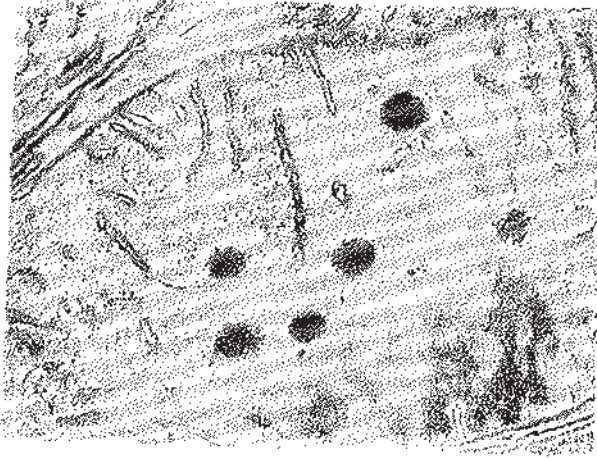
Baryum klorür ile muameleden sonra intramitokondriyal granülaların yoğunluk, büyüklük ve sayılarının artışı kalsiyum



Resim 6 — Glutaraldehit-osmium tetroksid ile tesbit edilmiş ve kalsiyum asetat içeren ortamda 6 saat enkübasyona bırakılmış böbrek korteksi kesiti. Bir tubulus proksimalis epitel hücresinin intrasitoplazmik membranlarla sınırlanmış bazal sitoplazma kompartmanlarındaki mitokondriyaların matriksi içinde görülen intramitokondriyal granülolar yoğunluk sayısı ve büyüklük itibariyle artmış durumda. Bunlar tam homojen değil, ince granüler yapıları özellikle sağ üst köşedeki iri bir intramitokondriyal granüloda iyi görülüyor. Mitokondriya matriksi az yoğun, krista mitokondriyalisler ise genişlemiş durumda. X 28500.

asetat ile muamele edilmiş materyelde gözlenene kıyasla daha az belirgindir. Bununla beraber, bunların kontrol gruba göre biraz daha iri oldukları ve daha sık rastlandıkları söylenebilir.

Bazı kasyonların oturdukları yerlerden uzaklaştırılması deneyleri, dokunun, söz konusu kasyonları kaldıran herbiri için özel etken madde ile muamele edilmesi suretiyle sağlandı. Böylece kalsiyumu kaldırıp uzaklaştırmak için etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), demiri uzaklaştırmak için desferal kullanıldı.



Resim 7 — Kuvvetli büyültme ile intramitokondriyal granüller az yoğun bir esas yapı üzerinde çok yoğun taneciklerin paralel veya radyer dizilmeleri suretiyle lameller bir yapı gösteriyorlar. X 62000.

dı. Bu işlemlere uğratılan materyele ait kesitlerde intramitokondriyal granülalarda önemli bir değişme yok. Yalnız EDTA ile muameleden sonra bunlar, biraz daha az yoğun ve sınırları az belirgindir. EDTA içeren ortamda enkübasyona bırakılan materyelde ayrıca genel hücre yapısının özellikle mitokondriya ve ribozomların iyi korunduğu bu organellerin kuvvetli bir kontrast ile ayrıntılı belirgin oldukları dikkati çekmektedir.

TARTIŞMA

Intramitokondriyal granüllerin lipidlerden zengin olduğu sıçan esmer yağ dokusunda (9), sıçan karaciğerinde (1), sıçan karaciğeri ve esmer yağ dokusunda (12) gösterilmiştir. Ancak sonuncu otörler bu granüllerin kloroform - metanol ekstraksiyonu ile kayboldukları halde hexane ile değişmeyip yine osmiyofil olarak ortaya çıktıkları için, nötral lipid değil fosfolipid yapısında olduklarını ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada ortaya konulan gözlemlere göre, intramitokondriyal granüller, elektron mikroskopinin olağan fikzatorü

osmium tetroksid ile tesbit edilmiş kesitlerde hemen siyah renkte çok yoğun olarak belirirler. Ancak bunlar osmium tetroksid tesbitini izleyen H_2O_2 ile işlemden sonra beyazlaşırlar. aynı şekilde tek başına glutaraldehit ile tesbit edilmiş materyelde de ancak nadiren ve pek az yoğun görülebilirler. Şu halde intramitokondriyal granülalar kuvvetli osmiyofildir. Bunlar oksidan madde osmium tetroksidi indirgeyerek indirgenmiş metal osmiumu üzerlerine çöktürürler. Osmiyofil maddelerin başında lipidler gelir. Gerçekten lipid eriticilerden etanol ile ekstraksiyondan sonra intramitokondriyal granülalar kaybolur. Fakat saf aseton ile işlem sonucunda pek değişmeksizin biraz daha az yoğun osmiyofil olarak ortaya çıkarlar. Bu bulgulara dayanarak intramitokondriyal granülaların fosfolipidlerden zengin oldukları sonucuna varılır. Esasen asetonun fosfolipidler için uygun eritici olmadığı, aseton ile ancak az miktarda fosfolipid eritilebildiği kromatografik ayırma yöntemi ile saptanmıştır. (3. 1).

Bu çalışmanın bulgularına göre intramitokondriyal granülalar RNA'nın sipesifik enzimi ribonükleaz ve DNA'nın sipesifik enzimi dezoksiribonükleaz ile enzimatik hidroliz olayı sonucunda etkilenmez, hiç değişmemiş olarak görülürler. Bu bakımdan bunların RNA ve DNA içermedikleri söylenebilir.

Intramitokondriyal granülaların kanyonlarla ilişkisi konusunda çok çeşitli görüşler mevcuttur. Bunların demir (5), kalsiyum ve diğer iyonların (10, 2, 4) çökmesinden oluştukları veya daha önce mevcut granülalar üzerine bu kanyonların oturması sonucunda yoğunluk ve büyüklüklerini artırdıkları, su ve iyon iletiminin şiddetli olduğu dokularda bol bulundukları (7) açıklanmıştır. Riedel, Bucher ve Erkoçak (1968) ın bulgularına göre, intramitokondriyal granülalar sodyum iyonlarının iletilmesine katılırlar, sodyumu ortaya koyan sitokimyasal yöntemin uygulanmasından sonra daha yoğun görülür, sürrenalektomi veya sodyumdan fakir rejim uygulayarak vücudun sodyumdan fakirleştirilmesi koşullarında ise daha az yoğun olurlar. O zaman iyi seçilebilen membran yapılarından oluşmuş bir düzen gösterirler.

Bu şimdiki çalışmada, intramitokondriyal granülaların fosfolipidlerden zengin oldukları ve bunlar üzerine hücrenin fizyolojik ve elektrolit durumuna bağlı olarak bazı katyonların hiç olmazsa kalsiyumun oturduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, Riedel, Bucher ve Erkoçak'ın yukarda belirtilen bulguları ile uyum halindedir. Zira membran yapıları bol fosfolipid içerirler ve osmiyofildirler. Membranlar üzerine hücre metabolizmasına ilişkin enzimler ile kalsiyum bağlanmış bulunur. Şu halde intramitokondriyal granülaların fosfolipidlerden zenginlikleri, osmiyofili ve kalsiyumu bağlama özellikleri bunların membranöz yapıları ile ilgili olabilir.

Intramitokondriyal granüle üzerine kalsiyum çökmesi, inorganik birleşik kalsiyum fosfat halinde veya organik bağlantı ile olabilir. Çalışmamızda kalsiyum içeren enkübasyon ortamında fosfat grupları bulunmadığı için, intramitokondriyal granüle üzerine kalsiyum çökmesi kalsiyumun organik bağlantısı ile olmalıdır. Kanımızca kalsiyum, intramitokondriyal granülanın esas yapısını oluşturan fosfolipidlerin fosfat gruplarına bağlanabilir. Kuvvetli büyültme ile intramitokondriyal granülanın lameller yapı göstermesi, elektronlara karşı yoğun olan kalsiyumun fosfolipid molekülü boyunca fosfat gruplarına bağlanmasından ileri gelebilir.

Yukarda belirtilen yapısal verilere dayanarak, intramitokondriyal granülaların fonksiyonu konusunda bazı yaklaşımlar yapmak olasılığı vardır. Bunlar, genel sitoplazma ve mitokondriya içi iyon hareketleri ve iletiminin düzenlenmesinde rol oynayabilir, ayrıca hücre solunumuna bağlı mitokondriyal metabolizma olaylarına katılabilirler.

ÖZET

Böbrek korteksinde tubulus proksimalisin intramitokondriyal granülalarının yapısı ve bazı katyonlarla ilişkisi sitokimyasal bir yaklaşımla elektron mikroskopda incelendi.

Osmium tetroksid ile tesbit edilmiş kesitlerde yoğun görülen intramitokondriyal granülalar, H_2O_2 ile işlemden sonra beyazlaşıyor, tek başına glutaraldehit tesbitinden sonra, nadiren ve az yoğun olarak seçilebiliyorlar. Bu bulgulara göre kuvvetli osmiyofil karakterleri saptanan bu granülalar, etanol ile ekstraksiyon sonucunda kayboldukları için lipidlerden zengindir. Ancak aseton etkisiyle değişmediklerine göre nötral lipidden ziyade fosfolipid içerdikleri söylenebilir.

Ribonükleaz ve dezoksiribonükleaz ile enzimatik hidrolizden etkilenmeyen intramitokondriyal granülalarda ne RNA ne de DNA mevcut değildir.

Kalsiyum asetat ortamında enkübasyondan sonra, kalsiyum iyonlarını üzerlerine biriktiren intramitokondriyal granülalar daha çok sayıda, daha iri ve yoğun oluyorlar. Bu gözlem baryum ile çok daha az belirgindir.

Bazı katyonların kaldırılıp uzaklaştırılması deneyleri, intramitokondriyal granülalarda önemli bir değişme meydana getiriyor.

Bu çalışmanın ve daha önceki diğer çalışmaların sağladığı yapısal verilerin ışığında, intramitokondriyal granülalara fonksiyonel yaklaşım yapıldı.

Etude ultrastructurale et cytochimique à propos des granules intramitochondriaux des cellules des tubes initiaux dans le cortex rénale

Résumé

La structure des granules intramitochondriaux des tubes initiaux du cortex rénale et leur relation avec certains cations ont été étudiées au microscope électronique avec une approche cytochimique.

Les granules intramitochondriaux qui se montrent dans les coupes fixées au tétroxyde d'osmium, blanchissent par le traitement au H_2O_2 ; après la fixation à glutaraldéhyde seule,

ils ne se distinguent que rarement et peu dens. Ces granules dont les caractères osmiophiles sont prouvés d'après ces observations, sont riches en lipides puisqu'ils disparaissent après l'extraction par l'éthanol, mais résistant à l'extraction par l'acétone ils contiennent des phospholipides plutôt que des lipides neutres.

Il n'existe pas ni ARN ni ADN dans les granules intramitochondriaux qui semblent résister à l'hydrolase enzymatique par l'action de ribonucléase et désoxyribonucléase.

Après l'incubation dans un milieu de l'acetate de calcium, les granules intramitochondriaux qui accumulent le calcium, paraissent de taille plus grande, plus nombreux et dens. Cette constatation est bien moins apparente pour barium.

Les expériences d'enlèvement de certains cations ne produisent pas une modification importante dans les granules intramitochondriaux.

Une approche fonctionnelle concernant aux granules intramitochondriaux a été faite à la lumière des données structurales obtenues par ce travail et par d'autres travaux antérieurs.

L I T E R A T Ü R

- 1 — Ashworth, C. T., Leonard, J. S., Eigenbrodt, E. H. and Wrightsman, F. J.: Hepatic intracellular osmiophilic droplets: effect of lipid solvents during tissue preparation J Cell Biol 31 301-318 (1969).
- 2 — Greenawalt, J. W., Rossi, C.S. and Lehninger, A. L.: Effect of activa accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria J. Cell Biol 23 21-38.
- 3 — Hanahan, D. J., Dittmer, J. C. and Warashina, E.: A column chromatographic separation of classes of phospholipids. J. Biol. Chem. 228 685 (1975).
- 4 — Peachey, L.D.: Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. J. Cell Biol., 20: 95 - 109 (1964).

- 5 — Richter, G. W.: A study of hemosiderosis with the aid of electron microscopy, *J. Exp. Med* 106 (1957).
- 6 — Riedel, B., Bucher, O. und Erkoçak, A.: Weitere befunde an den granula intramitochondrialia des distalen abschnittes der hauptstücke der meerschweinchenniere. *Z. Anat. Entwickl-Gesch.* 127 165-174, (1968).
- 7 — Rouiller, C.: *Internat. Rev. Cytol.*, (G. H. Bourne and J. F. Danielli, editors), 9: 227, 1960.
- 8 — Sanzone, G., Swartzendruber, D. C. and Snyder, F.: Inclusions of mitochondria of preputial glands from mice: a combined biochemical and morphological study. *Biochim. Biophys. Acta* 201 401 (1970).
- 9 — Suter, E. R. and Steaubli, W.: An ultrastructural histochemical study of brown adipose tissue from neonatal rats. *J. Histochem. and Cytochem.* 18 100-106 (1970).
- 10 — Vasington, F. D. and Murphy, J. V.: Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 237: 2770, (1962).
- 11 — Weiss, J. M.: Mitochondrial changes induced by potassium and sodium in the duodenal absorptive cell as studied with the electron microscope. *J. Exp. Med.*, 102: 783, (1955).
- 12 — Wendel, P. and Barnard, T.: A cytochemical approach to the lipid composition of mitochondrial matrix granules in brown adipose tissue and liver. *J. Histochem. Cytochem.* 22 1028 - 1033 (1974).