



MATERNAL OLARAK YÜKSEK DOZ RETİNOL ASETAT UYGULANIMINI TAKİBEN, SIÇAN HİPOKAMPUS CA1 HASARLANMASININ KANTİTATİF DEĞERLENDİRİLMESİ

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF HIPPOCAMPUS CA1 DAMAGING FOLLOWING MATERNALLY APPLICATION OF HIGH DOSE OF RETINOL ACETATE

Hüseyin AKTUĞ¹ Mine Ertem YURTSEVEN¹ Mert GÖL²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Anahtar Sözcükler: retinol asetat, hipokampus, morfometri

Key Words: retinol acetate, hippocampus, morphometry

ÖZET

Bu çalışmada, maternal olarak uygulanan Retinol Asetat (Vit A)'ın doza bağımlı teratojenik etkisinin, merkezi sinir sistemi ve özellikle olarak hipokampus dokusunda oluşturduğu değişikliklerin kantitatif olarak incelenmesi amaç edinilmiştir. Maternal olarak intraperitoneal yolla tek doz 40000 IU/kg retinol asetat, 160000 IU/kg retinol asetat ve %0.9 serum fizyolojik (kontrol grubu) uyguladığını takiben gebelik sonlanana dek beklenip, postnatal 1.gün intrakardiyak perfüzyon işleminden sonra yenidoğan sıçanların hipokampal dokuları çıkarılıp ışık mikroskopik takiplerinden sonra hazırlanan preparatlar 100lük büyütme altında incelenmiştir. Ödemli hücre ve normal konfigürasyondaki hücreler sayılmış ve morfometrik analizleri istatistiksel olarak yapılmıştır. Kontrol grubu ile retinol asetat verilen gruplar arasında anlamlı düzeyde istatistiksel farklılıklar saptanmıştır.

SUMMARY

In this study quantitative examination of dose dependent teratogenic effect of maternally applied Retinol Acetate (Vit A) on central nerve system and especially on variations caused at the tissue of the hippocampus was aimed. After maternally intraperitoneal application of single doses of 40000 IU/kg retinol asetat, 160000 IU/kg retinol acetate and %0.9 serum physiologic (control group) waited until the pregnancy was over. Postnatal first day after the intracardiac perfusion process, the hippocampal tissues of newborn rats dissected and after their follow-ups under a light microscope were accomplished the preparations made were examined as 100 times magnified. The cells with edema and the cells within the normal configuration were counted and the morphometric analysis statistically accomplished. Statistically significant differences between control group and retinol acetate given groups were detected.

GİRİŞ

A vitamini, merkezi (MSS) sinir sistemi gelişiminde çok önemli ve vazgeçilmez role sahip, erken embriyolojik dönemde esansiyel bir vitamindir. Yüksek doz A vitamini kullanımının gestasyon periyodu boyunca embriyolar üzer-

rine bazı teratojenik etkileride doza bağımlı olarak tanımlanmıştır. A vitamininin öğrenmeyle, bellekle olan ilişkisi, nörotransmitter, nöromodülatörlerle olan biyokimyasal bağı, yüksek doz kullanımdaki teratojenik etkileri, limbik korteks ve özellikle intra ve ekstrapokampal yolların aktif ve etken çalışabilmesi için bu yolların vitamin A'ya ihtiyaç duyması gibi özellikler dikkati hipokampus ve vitamin A ilişkisine çevirmiştir (1-3). Cleft palate formasyonu üzerine doza bağımlı dezor-ganizasyon, mandibular ve maxiller

Yazışma adresi: Hüseyin Aktuğ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Makalenin geliş tarihi: 14. 02. 2001 : kabul tarihi: 09 . 07. 2001

kemik gelişimi üzerine olan olumsuz etkileri, anormal kırıldak depolanması, relative makroglossia oluşumu, kulak gelişimi üzerine olan etkileri, özofagus düz kaslarında fibrozis yapıcı etkisi A teratojenik etkileridir (4, 5).

Bu çalışmada klinikte yaygın olarak kullanılan A vitamini ve türevlerinin teratojenik etkilerinin, MSS'de özellikle limbik korteks ve ağırlıklı olarak hipokampus üzerine olan gelişimsel histopatolojik etkilerinin araştırılması amaç edinilmiştir. A vitamininin MSS'de aşırı dozlarının gebelikte kullanımı embriyo üzerinde ciddi problemlere yol açar. A vitamini, hücrel diferansiyasyon ve hücrel proliferasyonun ikisinde de potent ajan olarak rol oynar, teratojenite ve bunun hücrel düzeydeki hasarları açısından bu özellik dikkate değerdir (6, 7). Uygulanan 40000 IU/ kg retinol asetat ve 160000 İÜ/kg retinol asetatın hücrel düzeyde hasarın net bir göstergesi olan ödeme yol açması ve bunun kantitatif olarak incelenmesi oldukça önemlidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

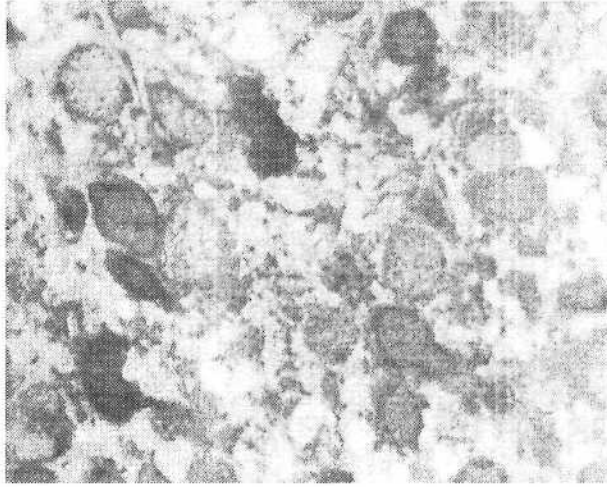
Maternal olarak uygulanan retinol asetatın hipokampus CA1 dokusunda oluşturduğu ultrastrüktürel zararlanmanın kantitatif değerlendirilmesi, gruplar arasında anlamlı istatistiksel farkın olup olmadığının tespiti için morfometrik analiz yapıldı. İlaç uygulama günü olarak serebral hemisfer, serebellum ve limbik korteksin tam olarak oluşmadığı embriyonik 8. gün tercih edildi. İlaç uygulaması intraperitoneal yolla tek doz yapıldı. Gebe sıçanların neonatal dönemdeki yavruları denek grubu olarak incelenmeye başlandı. Dissosiyatif anestezi için deneklere 0.10 mg ketalar +0.02 mg/kg rompun intraperitoneal olarak uygulandı, daha sonra intrakardiyak perfüzyon ile %2.5'lük fosfat tamponlu glutaraldehit solüsyonu tespit solüsyonu olarak kullanıldı. Perfüzyondan sonra fikse beyin dokusundan hipokampus dokusu CA1 bölgesi punch biopsi tekniği ile çıkarıldı. Ödemli hücre grupları ve normal hücre grupları sayımı daha önceki çalışmalardan uyarlanan morfometrik analize tabi tutuldu (5).

Her gruptan 4 sıçandan 5'er ardışık 6 mikron kalınlığında kesit alındı. Alınan kesitlerin rutin ışık mikroskopik takiplelerinden sonra sayım işlemine geçildi. Sayım işlemi; kontrol grubu (grup 1), 40000IU/kg retinol asetat uygulanan grup (grup 2), 160000 IU/kg uygulanan grup (grup 3) olmak üzere 3 grupta toplam 12 hayvan ve 60 preparatta gerçekleştirildi. Kesitler 100'lük ışık mikroskopik büyütme altında incelendi, ödemli ve normal hücre sayımı 100'lük ışık mikroskopik büyütme altında yapıldı. 3 gruptan sayılan toplam ödemli ve normal hücre sayıları hesaplanarak bu veriler Excel 5.0 grafik - matematik ve graphad 1.0 istatistik programları kullanılarak değerlendirildi.

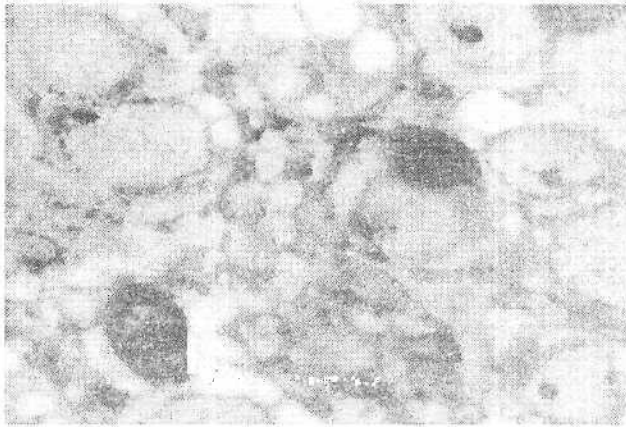
SPSS 9.0 for windows paket programında, One Way ANOVA ve post - hoc test Bonferroni yöntemi ile istatistiksel analiz yapılmıştır.

BULGULAR

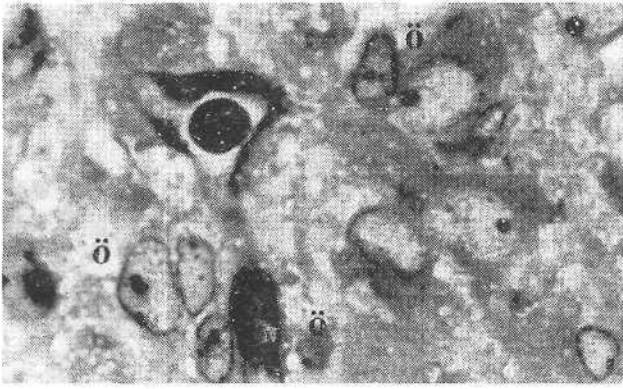
Morfometrik olarak ödemli hücre grubunun ve normal konfigürasyonlu hasarsız hücre grubunun sayısal analizi yapıldı. Kontrol grubundan toplam olarak 1057 hücre ışık mikroskopunda 100'lük büyütme altında sayıldı. Bu sayılan hücrelerden 964'ünde ödeme bulgusuna rastlanmazken 93'ünde ödeme rastlandı ki bu da % 8.79 gibi bir orana tekabül ediyordu, ilaç uygulanan grupların incelenmesine geçildiğinde: 40000 İÜ/kg retinol asetat uygulanan grupta 1260 adet hücre sayıldı ve ödemli hücre sayısının artışı dikkat çekiciydi; bu 1260 adet hücreden 407'sinde ödeme rastlanılırken (% 32 30), 853 hücrede ödeme bulgusu saptanmadı. 160000 İÜ/kg uygulanan grupta 924 hücre sayıldı, bunlardan 503'ünde ödeme saptandı (% 54 43)



Resim 1. Kontrol grubu (Grup 1), Işık Mikroskopi x100 büyütme Toluidin Blue boyama



Resim 2. 40000 İÜ/kg Retinol Asetat (Vit A) uygulanan grup (Grup 2) Işık Mikroskopi x100 büyütme. Toluidin Blue boyama. ö:ödemli alan



Resim 3. 160000 İU/kg Retinol Asetat (VitA) uygulanan grup (Grup 3), Işık Mikroskopi x100 büyütme. Toiuidin Blue boyama. ö:ödemli alan

SPSS paket programından ONE WAY ANOVA istatistiksel yöntemine göre normal hücre (* F=97.29; p=0.05) ve ödemli hücre sayısı bakımından (** F=15873; p=0.05) gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı. Ayrıca POST HOC TEST BONFERRONI yöntemiyle yapılan analizde normal hücre sayılarına göre: grup 1 ile 2 (p=0,019) ve Grup 2 ile 3 (p=0,001) ve Grup 1 ve 3 (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. Yine POST HOC TEST BONFERRONI yöntemiyle yapılan analizde ödemli hücre sayılarına göre: grup 1 ile 2 (p=0,019) ve Grup 2 ile 3 (p=0,001) ve Grup 1 ve 3 (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.

Tablo 1. Gruplara göre normal ve ödemli hücre sayısı karşılaştırması

Grup 1 (KONTROL) n=20		Grup 2 (40000 İU/kg RA) n=20		Grup 3 (160000 İU/kg RA) n=20					
Normal	Ödemli	Normal	Ödemli	Normal	Ödemli				
34	1	24	7	28	18				
50	4	44	17	28	33				
35	5	49	22	28	29				
55	7	48	19	22	30				
48	6	48	21	19	23				
48	5	49	23	13	30				
56	5	53	20	31	28				
56	7	40	17	21	23				
52	8	28	21	27	33				
52	6	48	20	30	33				
44	4	41	17	15	27				
47	5	48	23	17	25				
56	6	36	28	9	22				
47	4	40	23	24	21				
41	1	39	18	18	19				
46	2	42	29	16	21				
48	6	40	22	14	26				
41	2	37	23	24	24				
50	3	43	20	20	23				
58	6	46	17	17	23				
Ort± SEM	48.20 ± 1.51	Ort± SEM	42.65 ± 1.45*	Ort± SEM	20.35 ± 1.02	Ort± SEM	21.051 ± 40*	Ort± SEM	25.15 ± 0.96

TARTIŞMA VE SONUÇ

Retinol asetat; hücrenin differansiyasyon ve proliferasyon süreçlerinde etkili, özellikle erken embriyolojik dönemde esansiyel bir preparattır, günümüzde oldukça sık kullanılan, yaygın olarak tüketilen, klinik konsantrasyonlarda kullanımı kabul gören, yapılan birçok deneysel çalışmada karsinogenesis üstüne supresyon yapıcı etkisi gösterilen bir vitamindir, (8).

Retinol Asetat'ın nörotransmitter ve nöromodülatörlerle olan biyokimyasal bağı, uzun dönem hafızaya etkileri, yüksek dozlarda intrakraniyal basıncı artırması ve psödotürnör serebri yapması dikkatleri santral sinir sistemi ve vitamin A etkileşimi üzerine çekmiştir. Ayrıca hipokampusun yerleşim açısından kritik lokalizasyonu yine hipokampal bölgenin nörotransmitter akışını sağlamada önemi, ayrıca hipokampusun sahip olduğu polisaptik

yollar sebebiyle çalışılacak bölge hipokampus olarak tespit edildi ve yüksek doz retinol asetat'ın hipokampus dokusunda oluşturduğu teratojenik etkiler incelendi. Bu konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmada entorhinal kortekste dejenerasyon, subikular hücrelerde kayıp, yapısız boşluk olarak görülen ödem sıvısı belirgindi (7, 8). Bu çalışmada da özellikle interstisyel alanda yaygın ödeme rastlandı, intraaksonal ödem yaygındı, yer yer intrasitop- lazmiik ödem bulgusuyla da karşılaşıldı.

Ödemli hücre grupları sayısal analizinde en çarpıcı sonuçlar son grupta yani 160000 İU/kg retinol asetat uygulanan grupta bulundu, toplam sayılan 924 hücreden 503 tanesinde odam bulgusuna rastlandı bu % 54.43 gibi bir orana denk geliyordu ve doz artışına paralel olarak hücre hasarlanması ve ödem artışını kantitatif olarak belirtiyordu. Kontrol grubundaki % 8.79'luk oran ve bu oranın yüksek doz retinol asetat uygulaması ile % 54.43'e çık-

ması retinol asetatın, yüksek dozunun nörotoksositeye yol açması anlamında dikkat çekiciydi.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Normal hücre sayısı açısından grup 1 ile grup 2 ve grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel yönden (sırasıyla $p=0.019$ ve $p=0.001$) anlamlı farklılıklar saptandı. Ödemli hücre sayısı açısından da grup 1 ile grup 2 ve grup 1 ile

grup 3 arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar saptandı. Ödemli hücre sayısı Retinol asetat uygulamasını takiben artarken, normal hücre sayısında Retinol asetat uygulamasını takiben doz artışına paralel bir azalma saptandı. Tüm bunlar, Retinol asetatın yüksek doz uygulamasının ödem bulgusu ve dolayısıyla nörotoksosite ile beraber olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Amaral D.G, Insausti R, Cowan W M. The entorhinal cortex of the monkey: III.Subcortical afferents.. J.Comp.Neurol. 1987;15;264 (3):396-408.
2. Amaral D.G, Insausti R, Cowan W M. The entorhinal cortex of the monkey: II.Cortical afferents. J.Comp.Neurol. 1987;15; 264 (3):356-395.
3. Amaral D.G, Insausti R, Cowan W M. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. J.Comp.Neurol. 1987; 15; 264 (3):307- 36.
4. Racca C, Stephenson F.A, Streit P, David J, Roberts B, Somogyi P. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA 1 area. The Journal of Neuroscience 2000; (7), 2512-2522
5. Zaidel E, Clarke J M. Anatomical-behavioral relationships:corpus callosum morphometry and hemispheric specialization. Behav. Brain Res 1994; 64 (1- 2):185-202.
6. Rente .CA, Miller A S. The effect of hypervitaminosis A on rat palatal deveiopment. Teratology 1978; 8; 277-284.
7. Levi S, Wolf G. Purification and properties of the enzyme atp- sulfurylase and its relation to vitamin A. Biochim. Biophys. Açta. 1969:262-282.
8. Pauken C M. Laborde J B. Bolon B. Retinoic acid acts during periimplantational deveiopment to brain formation. Anat Emb (Beri) 2000; (6): 645-55