

Yüksek Doz Maternal Vitamin A (Retinol Asetat) Uygulamasına Bağlı Olarak Neonatal Sıçanlarda, Böbrek Korteksinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi¹

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF MATERNAL APPLICATION OF HIGH DOSE VITAMIN A ON RENAL CORTEX

Hüseyin AKTUĞ*, Naime AKDEDE**, Mine YURTSEVEN***, Ayşegül UYSAL****, Serap USLU**, Gülperi ÖKTEM*****

* Uzm.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,
** Arş.Gör., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,
*** Prof.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,
**** Doç.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,
***** Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, İZMİR

Özet

Amaç: Vitamin A'nın organogeneziste kritik bir rol oynadığı ve nefrojenезisi etkileyen önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Vitamin A eksikliği meydana getirilerek yapılan çalışmalarda, böbreğin de içinde bulunduğu bazı gelişimsel malformasyonlar gösterilmiştir. Gebelik esnasında Vitamin A eksikliğine bağlı olarak fetusun glomerül sayısında azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, yüksek doz Vitamin A uygulanan halinde, yenidoğan sıçanlarda glomerül sayısındaki morfolometrik değişim incelendi ve renal korpuskül yapısının ışık ve elektron mikroskopik bakışı amaçlandı.

Materyal ve Metod: Sıçanlar, kontrol grubu, I (40000 IU/kg) ve II (160000 IU/kg) deneysel grup olmak üzere üç gruba ayrıldı. İlaç uygulaması (Vitamin A) embriyonik 8.gün intraperitoneal tek doz olarak uygulandı. Yenidoğan sıçanlardan alınan böbrekler, ışık mikroskobu düzeyinde morfolojik olarak incelenmiştir. Hazırlanan preparatlar, rutin elektron mikroskop takibine alınmış, renal korpuskül ince yapısına bakılmıştır. Kontrol grubu ile Vitamin A uygulanan grupların glomerül oranının gösterilmesi amacıyla yarı ince kesitler, toluidin blue ile boyanmıştır.

Bulgular: Bu kesitlerde, Vitamin A uygulanan sıçanlar ile kontrol grubu arasındaki glomerül sayısında; oransal olarak belirgin bir artış saptanmıştır (%26).

Anahtar Kelimeler: Retinol Asetat, Elektron Mikroskop, Böbrek

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:369-372

Summary

Purpose: It is well known that Vitamin A plays a critical role in organogenesis and is an important factor affecting nephrogenesis. In the studies conducted through creating Vitamin A deficiency, some developmental malformations including kidney were demonstrated. It was reported that number of fetus glomerulus decreased due to Vitamin A deficiency during pregnancy. In this study, in case of application of high dose Vitamin A, in newborn rats the morphometric change within the number of glomeruli examined and light and electron microscopic examination of renal corpuscle structure was carried out.

Material and Methods: Rats were divided into three groups; control, group I (40000 IU/kg) and II (160000 IU/kg) experiment group. Application of medicine (Vitamin A); embryonic 8 day intraperitoneal single dose. Kidneys taken from newborn rats were examined morphologically with the light microscope. Preparations made were followed through routine electron microscope and the fine structure of renal corpuscle considered. In order to show the glomerul rates of control group and the group that Vitamin A applied, semi-thin cross-sections were dyed with toluidin blue.

Results: In these cross-sections, a proportionally apparent increase was detected in the number of glomerules between control group and the rats that Vitamin A applied (26%).

Key Words: Retinol Acetate, Electron Microscope, Kidney

T Klin J Med Sci 2002, 22:369-372

Fetuslarda nefronların gelişiminde Vitamin A'nın bulunması kritik bir rol oynamaktadır ve böbrek maturasyonunun sağlanmasında önemlidir (1). Anneden gelen Vitamin A eksikliğinin konjenital malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (1,2,4,5).

Vitamin A ve retinoik asitin son zamanlarda; fare metanefrik organ kültürlerinde, nefron sayılarının kontrolünde anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (2, 6).

Söz konusu çalışmada (3), nefronların sayıları kandaki Vitamin A'nın miktarıyla bağlantılı bulunmuştur. Ancak yüksek doz Vitamin A alınması durumunda, glomerül sayısında meydana gelebilecek olası morfolometrik değişime ait bulgulara rastlayamadık. Biz bu amaçla, bu çalışmada yüksek doz Vitamin A alınması halinde; retinol oranı ile nefron sayılarının seviyelerini morfolometrik yönden ölçmeyi ve renal korpuskül yapısını, ışık ve elektron mikroskopta incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, ortalama ağırlıkları 200 g olan 15 adet gebe sıçan (*Rattus albinus*) ve bunlardan doğan 5-7 g ağırlıkları olan 5'er yenidoğan sıçan kullanıldı. Sıçanlar üç eşit gruba ayrıldı.

a-) Kontrol grubu (n:5)

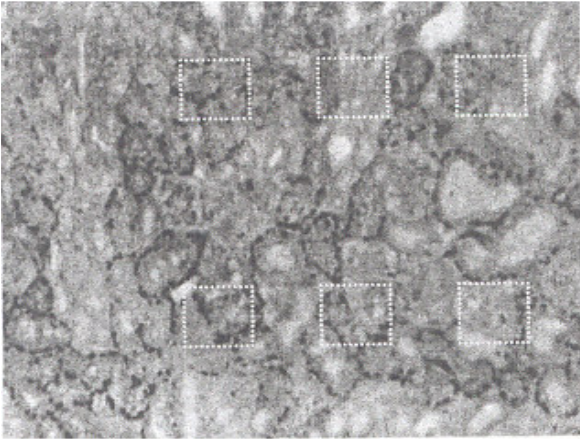
b-) E7.gün 40000 IU/kg Retinol Asetat (Vit A) uygulanan grup (n:5)

c-) E7.gün 160000 IU/kg Retinol Asetat (Vit A) uygulanan grup (n:5)

Retinol Asetat (Vit A) gebe sıçanlara intraperitoneal tek doz olarak uygulandı, 18-19 derece sıcaklıkta hipotermi ve hiperterminin olası zararlı etkileri ekarte edildi. 12 saat gece 12 saat gündüz yaşam şartlarında doğum yapmaları sağlandı. Neonatal sıçanlar ilk 6 saat içinde çalışma grubu olarak alındı, 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) tespiti yapıldı. Böbrekler çıkarılarak rutin ışık ve elektron mikroskopik takibe alındı ve epon 812'ye gömüldü. Tüm grupların böbrek korteksindeki glomerül sayısının morfolojik inceleme ve stereolojik sayımları, toluidin blue ile boyanan yarı ince kesitlerde değerlendirildi. Hücre sayımı sırasında Weibel Metodu kullanılarak seçilen kesitler üzerinde 'Klasik Büyük Partikül Sayım' metodu kullanılarak, hücre sayımı yapıldı. Yarı ince kesitlerde, alana düşen tüm hücreler değil; sadece düz siyah çizgilere değen ve merkezde + işaretine düşen glomerüller sayıldı (Şekil 1,2). Bu alanların dışında kalan ve yarı- kesik çizgili alana gelen glomerüller sayılmadı. İnce kesitler ise Zeiss EM9 elektron mikroskopunda incelendi.

Bulgular

Kontrol grubu, I. (40000 IU/kg) ve II. (160000 IU/kg) gruptan alınan yarı-ince kesitlerde, alanda bulunan tüm



Şekil 1. Kontrol grubu yenidoğan sıçan böbrek korteksinde glomerül morfolojik sayımı. Toluidin Blue, 10x10.

hücreler göz önüne alınarak toplam 300 hücre sayıldı. Bu sayım sırasında tespit edilen glomerüller değerlendirildi. Kontrol grubu ile ilaç verilen diğer iki grup değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile I.grup arasında istatistiksel anlamlı fark gözlemlendi. I.grupta glomerül sayısının %26 oranında artmış olduğu tespit edildi (Aşağıdaki formüle dayanılarak).

Formül:

$$NVİ=NA^{1/2}/Beta \cdot VVİ^{1/2}$$

NVİ=Number of pervolume

NAİ=Number of transections of I persection area

VVİ= Fraction of tissue volume

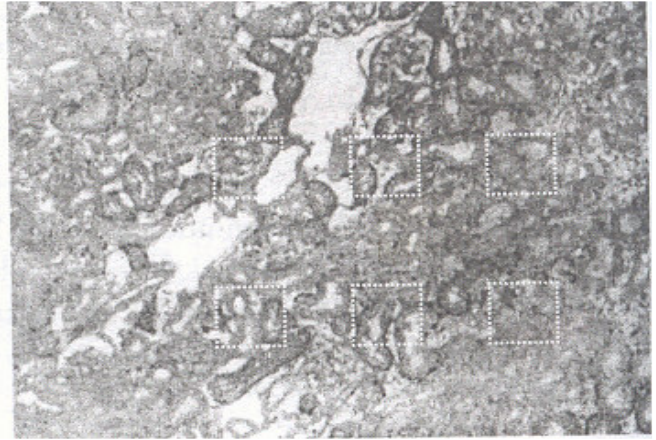
beta= standart değer 1,38

I.grup ile II. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. Yarı ince kesitler toluidin blue ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi. Kontrol grubunda olağan renal korpusküller bulguları görüldü. (Şekil 3,4). Her iki deney grubunda ise; 160000 IU/kg verilen sıçan yenidoğan böbrek korpusküllerinin çoğunda olmak üzere, proksimal tübülün, Bowman kapsülü Lamina parietalisine doğru proliferasyon gözlemlendi (Şekil 5,6).

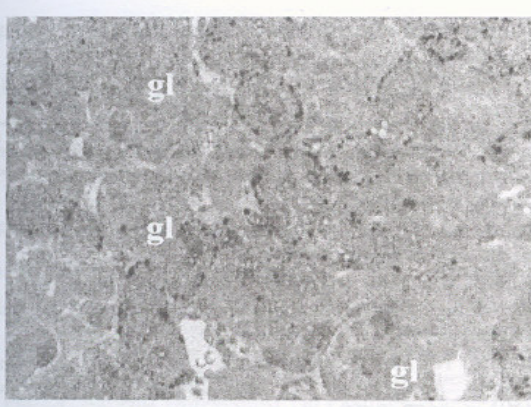
Elektron mikroskopik incelemede, kontrol grubunda; podosit sitoplazmik yapıları, pediseller, bazal membran, endotel hücrelerinin, normal histolojik ince yapı özellikleri gösterdiği bulundu (Şekil 7). I. grupta, kontrol grubuna benzer renal korpuskül ince yapısı ayırtedildi. Bazal membranları; lamina densa ve lamina rara'lar belirgin olarak bulundu (Şekil 8). 160000 IU/kg doz verilen II.grupta incelenen kesitlerde, bazal membranda ve pedisellerde düzensiz bir ince yapı gözlemlendi. Endotel hücrelerinin sitoplazmalarında vezikül artışı görüldü (Şekil 9).

Tartışma ve Sonuç

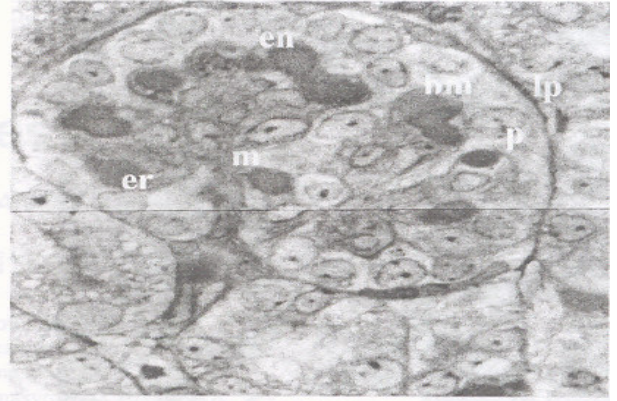
Alınan sonuçlar doğrultusunda glomerül sayısındaki artışın, doza bağımlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu



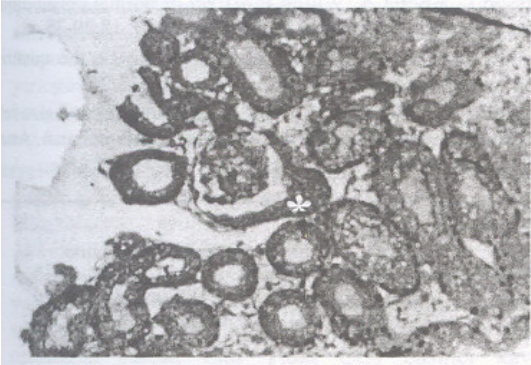
Şekil 2. 40000 IU/kg uygulanan yenidoğan sıçan böbrek korteksinde glomerül morfolojik sayımı. Toluidin blue, 10 x10.



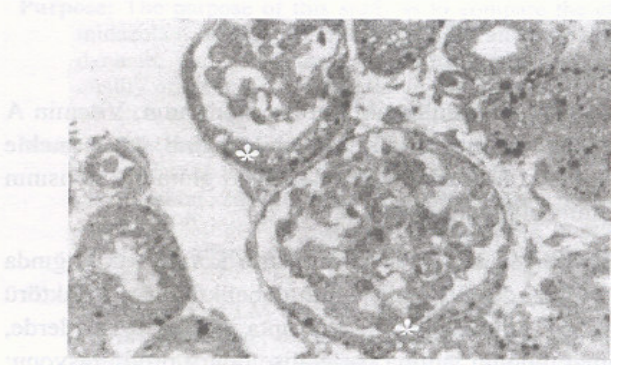
Şekil 3. Kontrol yenidoğan böbrek korteksi genel görünümü.Toluidin Blue, 10x20.



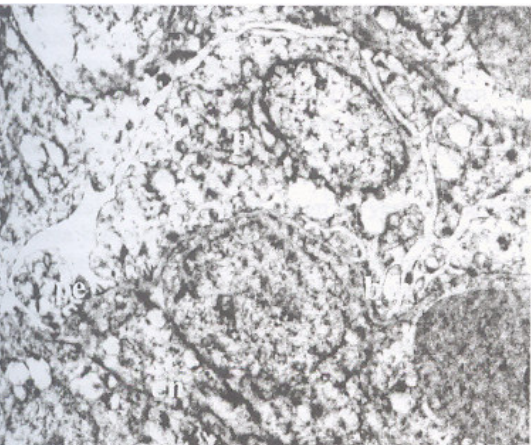
Şekil 4. Kontrol grubu renal korpüskül Toluidin blue, 10x100.



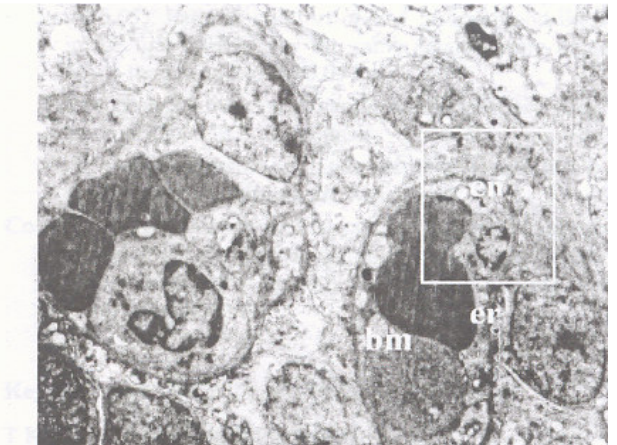
Şekil 5. 1600000 IU/kg uygulanan yenidoğan sıçan böbreğinde proksimal tübülün lamina parietalise doğru proliferasyonu (*)Toluidin blue, 10x20.



Şekil 6. 160000 IU/kg uygulanan yeni doğan sıçan böbreğinde proksimal tübülün lamina parietalise doğru proliferasyonu (*) Toluidin blue, 10x40.



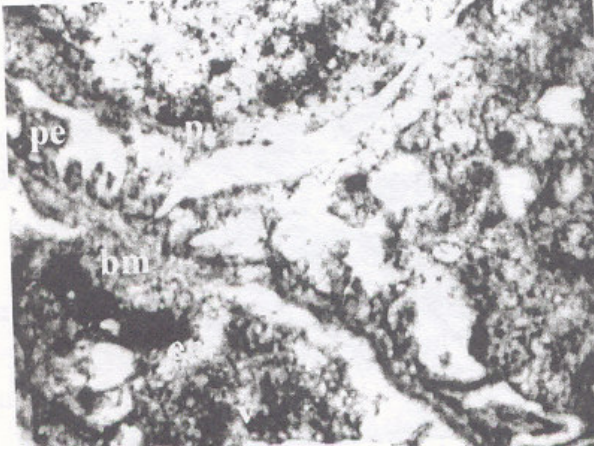
Şekil 7. Kontrol yenidoğan böbrek korteksi EM genel görünümü x1750.



Şekil 8. 40000 IU/kg uygulanan yenidoğan sıçan renal korpüskül ince yapısı x1750.

çalışma Vitamin A fazlalığının yenidoğan sıçanlar için belirgin bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda Vitamin A eksikliği olan annelerden doğan yavrularda nefrojenenezisin zarar gördüğü ve nefron sayılarının azaldığı bilinmektedir (1, 2, 6, 7).

Kontrol grubu ile Vitamin A verilen 40000 IU/kg'lık ve 160000 IU/kg'lık grup arasında nefron sayısının arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile I.grup arasındaki bu artış %26 oranında bulundu. I.grup ve II. grup arasında anlamlı bir artış saptanmamıştır. Sonuç olarak bu çalışma



Şekil 9. 160000 IU/kg uygulanan yenidoğan sıçan renal korpüskül ince yapısı x1750 EM görüntüsü.

bize, yenidoğan sıçanlardaki nefron sayılarının, Vitamin A seviyesiyle doğru orantılı olabileceğini göstermekle birlikte; belli bir dozdan sonra dokudaki glomerül sayısının sabitlenmiş olduğunu gösterdi.

Bu çalışmada, diğer çalışmalarla korele bakıldığında (6- 8) yüksek doz Vitamin A'nın gebelikte bir risk faktörü olacağı; ışık mikroskopunda II.grupta incelenen kesitlerde, proksimal tübülün lamina parietalise doğru proliferasyonu; ayrıca elektron mikroskopunda yapılan incelemelerde

podositlerin pedisellerindeki ve bazal membran yapısındaki düzensizlik bulgularıyla da desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Lelievre-Pegorier M, et al. Mild Vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney International* 1998; 54, 1455-62.
2. Vilar J, et al. Kidney development and Vitamin A. *Kidney International* 1996; 49: 1478-87.
3. Howard.CV, and Reed.MG. *Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy.* Bios scientific publishers, 1998.
4. Potter E. Normal development of the kidney, in normal and abnormal development of the kidney. *Year Book Medical Publishers, 1972: 3-74.*
5. Shenai J, Chytil F, Jhaveri A, Stahlman M. Plasma Vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates. *J.Pediatr,* 1981, 99; 303-5.
6. Larsson L, Aperia A, Wilton P. Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int,* 1980, 18:29-35.
7. Dunnill M.S, Halley W: Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. *J.Pathol.*1973, 110:113-21.
8. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992, 232: 194-201.

Geliş Tarihi: 07.09.2001

Yazışma Adresi: Dr.Hüseyin AKTUĞ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,
Bornova, İZMİR

[§]*Bu çalışma 28-31 Ağustos 2000 tarihinde V.Ulusal Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji kongresinde poster olarak sunulmuştur.*