

Yüksek doz A vitamininin karaciğer üzerine etkileri ışık mikroskopik çalışma

Neriman ÇOLAKOĞLU, Aysel KÜKNER

F.Ü.T.F. Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Bu çalışmada yüksek doz all-trans retinoik asidin karaciğer dokusu üzerine olan etkileri araştırıldı. Çalışmada 12 adet ergin erkek Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. I.grup: On beş gün boyunca oral yoldan 20 mg/kg/gün all-trans retinoik asit verilen sıçanlar (n:4) II.grup: On beş gün boyunca oral yoldan 40 mg/kg/gün all-trans retinoik asit verilen sıçanlar (n:4) III.grup: Kontrol olarak kullanılan sıçanlardan oluşturuldu. (n:4) Deneyin sonunda sıçanlar eter anestezisi altında öldürülüp karaciğer dokuları alınıp ışık mikroskopik incelemeler için Boin solüsyonunda tespit edildi. Parafin bloklar hazırlanıp 5 mm'lik kesitler alındı. Hazırlanan kesitlere farklı boyalar uygulanıp ışık mikroskopta incelendi. Deney gruplarının karaciğer lobüllerinin periferel zonundaki hepatosit sitoplazmalarının boyanmadığı görüldü. Yine lobüllerin periferel zonlarında aktive olmuş Kupffer hücre yoğunlaşmaları görüldü. Bu bulguların paralelinde deney gruplarının lobül yapılarında bozulmalar saptandı. Yapısal değişiklikler 40mg/kg/gün all-trans retinoik asit verilen gruplarda daha şiddetli düzeyde idi.

Anahtar Kelimeler : Karaciğer, A vitamini, ışık mikroskop

SUMMARY

Effects of high doses vitamin A on liver

The effects of excess all-trans retinoic acid on liver tissue were investigated in this study. Twelve adult male Wistar rats were used. The animal were divided into three groups. I. group: 20 mg/kg/day all-trans retinoic acid was given to rats (n:4) by oral gavage, during 15 days II.group: 40 mg/kg/day all-trans retinoic acid was given to rats (n:4) by oral gavage, during 15 days III.group: Rats were used as control (n:4) End of experimental study, rats were killed under ether anesthesia. Liver tissues were taken and fixed with Boin's solution for light microscopic observation. Paraffin blocks were prepared and 5 mm sections were stained different methods. Later, sections were examined with lighth microscope. In the experimental groups, the cytoplasms of hepatocytes in the peripheral zone of liver lobules were stainless. Excess cell infiltration which were considered activated Kupffer cells, observed at the peripheral zone. Moreover, hepatic lobule structure of experimental groups were destroyed. This findings were more serious for intake 40 mg/kg/day all-trans retinoic acid rats.

Key Words: Liver, vitamin A, light microscopy

A Vitamini ile yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkili olan bileşiklere retinoidler denilmektedir (1). Görme, üreme, büyüme, farklılaşma ve sağlıklı bir epitel dokunun sürekliliği gibi bir çok biyolojik olayda retinoidlere gereksinim duyulmaktadır (1,2). Diyetle alınan A vitamini oksidasyona uğrayarak hücre

içinde all-trans retinoik aside dönüşmektedir (1). A vitamini ve sentetik analogları akne ve diğer cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. A vitamininin aynı zamanda kanserin önlenmesinde de rol oynadığı bildirilmektedir (3,4).

Yüksek miktarda A vitamini tüketimi organizmada

Haberleşme Adresi: **Neriman ÇOLAKOĞLU**, F.Ü.T.F. Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

Geliş Tarihi : 15.12.2000

Yayına Kabul Tarihi : 25.01.2001

toksik etki göstermektedir. Akut durumlarda geçici hidrosefali ve kusma kronik durumlarda ise anoreksi, kilo kaybı, baş ve karın ağrısı, ciltte döküntüler, dalak, karaciğer ve lenf bezlerinde büyüme ve poliüri oluşmaktadır (2). Gebelik esnasında fazla miktarda A vitamini tüketilmesi kongenital malformasyonlara yol açmaktadır. 1983 yılından beri yüksek doz retinoik asidin teratojenik olduğu bilinmektedir. Gebeliğin 3. ve 5. haftalarını kapsayan dönemde alınan yüksek doz A vitamini kranio-fasiyal anomalilere, yarık damak, timik aplazi ve nöral tüp defektleri gibi ciddi problemlere yol açmaktadır (5). Tzimas G. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada oral yoldan verilen 2 – 10 mg/kg/gün all-trans retinoik asit dozlarının en düşük embriyo toksik dozlar olduğunu bildirmektedirler (4). Oral olarak verilen 25 mg/kg/gün aromatik retinoid'in kobaylarda ve sıçanlarda toksik etki gösterdiği bildirilmektedir (6, 7). A vitamininin vücutta birincil olarak depolandığı organ karaciğerdir (8). Kronik hipervitaminosis A durumunda hepatositlerde bozulma ve hepatik fibrozis şekillenmektedir. Sinuzoidlerde ve terminal venüllerde tıkanıklık, Disse aralığında kollagen birikimi (9), İto hücrelerinin sayısı ve büyüklüklerinde artış meydana gelmektedir (9, 10). Kudo S, yüksek dozda intraportal retinol enjeksiyonu sonucu hepatositlerde değişik büyüklük ve sayıda vakuolizasyon oluştuğunu, bu duruma granüllü endoplazmik retikulum keselerinin genişlemesinin yol açtığını belirtmiştir (11). Organizmaya yüksek dozda A vitamini yüklenmesi sonucunda plazma ve karaciğerdeki A vitamini düzeyinde, serum enzimlerinin miktarlarında artış ve epitelyal hiperplazi meydana gelmektedir (12). Yüksek doz A vitamini, İto hücrelerinde lipid birikimine ve bu hücrelerin proliferasyonuna yol açmakta ve Kupffer hücrelerini aktive etmektedir (13).

Bu çalışmada iki farklı doz A vitamininin karaciğer dokusu üzerine olan etkileri ışık mikroskopik düzeyde incelenerek, doza bağlı ortaya çıkan yapısal değişiklikler tartışıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 12 adet ergin Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı.

I.Grup: 15 gün boyunca günde 20 mg/kg oral doz all-trans retinoik (Vitamin-A-acid, Biochem, Fluka) asid verilen sıçanlar (n:4)

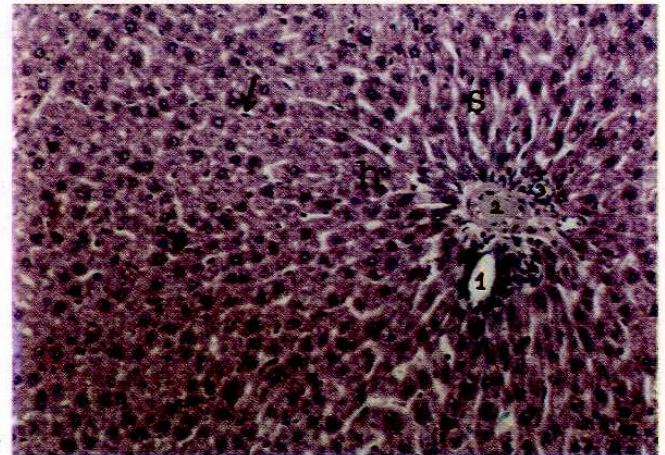
II.Grup: 15 gün boyunca günde 40 mg/kg oral doz all-trans retinoik asid verilen sıçanlar (n:4)

III.Grup: Normal beslenmesine devam eden kontrol grubu olarak kullanılan sıçanlar (n:4)

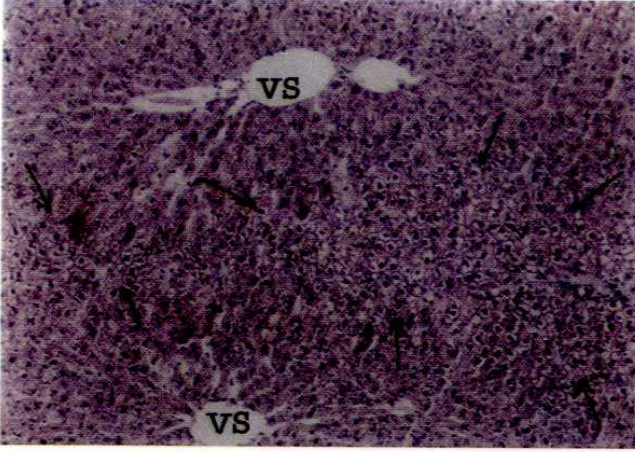
Deney sonunda sıçanlar eter anestezisi altında öldürülüp karaciğer dokuları alındı ve Boin solüsyonunda tespit edildi. Dereceli alkollerden geçirilip tespit materyali uzaklaştırıldı. Parafin bloklar hazırlanıp 5 mm'lik kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eosin, Masson's Trichrom, Retikulum (Gümüşleme) ve Periodicacid Schiff (PAS) boya ile boyandı. Olympus BH2 fotomikroskobu ile incelenip görüntüldü.

BULGULAR

Işık mikroskopta yapılan incelemeler sonucunda yüksek dozlarda verilen A vitamininin karaciğer dokusunda toksik etki gösterdiği tespit edildi. Kontrol grubu deneklerde vena sentralis, hepatositlerin oluşturduğu Remark kordonları, sinuzoidle, Kupffer hücreleri, portal alan ve çevresi normal yapıda gözlemlendi (Şekil 1). On beş gün boyunca oral 40 mg/kg/gün dozda all-trans retinoik asid verilen deneklerin karaciğerinde; özellikle periferel zondaki hepatositlerin şişkin olduğu, sitoplazmalarının boya almadığı gözlemlendi. Bu bölgelerde sinuzoid yapıları belirgin değildi (Şekil 2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında v. sentralis çevresinde sitoplazmaları boya alan ve portal alan çevresinde sitoplazmaları



Şekil 1. Kontrol grubu karaciğer dokusunda portal alan ve çevresindeki hepatositler görülmekte. Vena portanin dalı (1), hepatik arterin dalı (2), safra kanalı (3), hepatositler (h), sinuzoidler (s), Kupffer hücreleri (ok). Weigert Hematoksilen – Eosin x 20

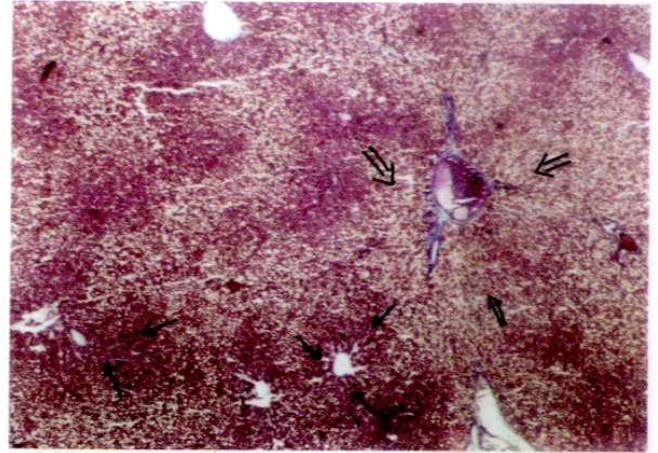


Şekil 2. 40 mg / kg all-trans retinoik asid verilen deney grubunda vena sentralis (vs) çevresindeki hepatositlerin bütünlüklerini koruduğu, periferel zondaki hepatositlerin sitoplazmalarının boyanmadığı (oklar) görülmekte. Weigert Hematoksilen – Eosin x 10

boya almayan hücrelerden oluşan heterojen bir yapının meydana geldiği ve normal lobül yapısının bozulduğu gözlemlendi (Şekil 3,4). Damarların içlerinde lenfosit ve monositlerin artışları dikkat çekiciydi (Şekil 5). Genellikle lobüllerin periferel zonlarında hücre yoğunlaşmaları tespit edildi. Bu yoğunlaşan hücrelerin aktive olmuş Kupffer hücreleri olduğu görüldü (Şekil 6). On beş gün boyunca oral 20 mg/kg/gün dozda all-trans retinoik asit verilen deneklerin karaciğer dokusu incelendiğinde etkilenmenin 40

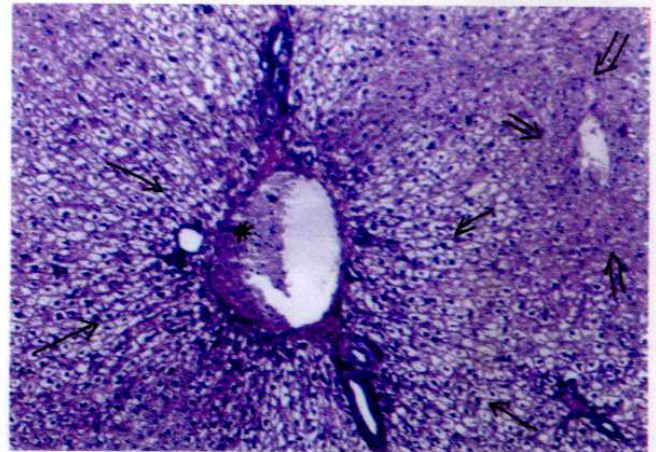


Şekil 3. Kontrol grubunun karaciğer lobül yapısı görülmekte. Vena sentralis (vs) ve portal alan (p) çevresindeki hepatositlerin homojen boyandığı izlenmekte. Hematoksilen – Eosin x 4

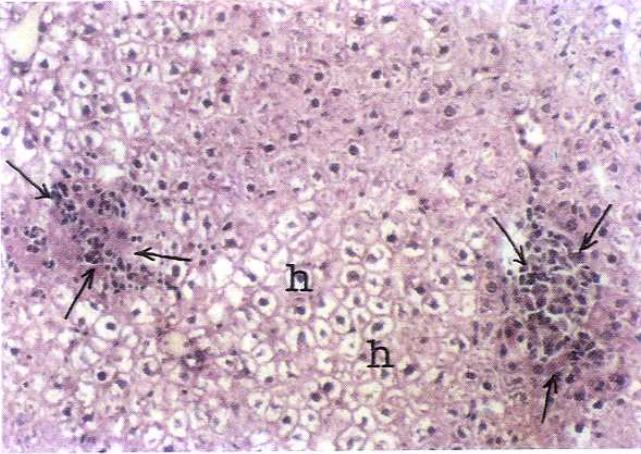


Şekil 4. 40 mg / kg all-trans retinoik asid verilen deney grubunda vena sentralis çevresindeki hepatositlerin boyandığı (tek oklar), portal alan çevresindeki hepatositlerin ise boyanmadığı (çift oklar) belirgin olarak görülmekte. Masson's Trichrom x 4

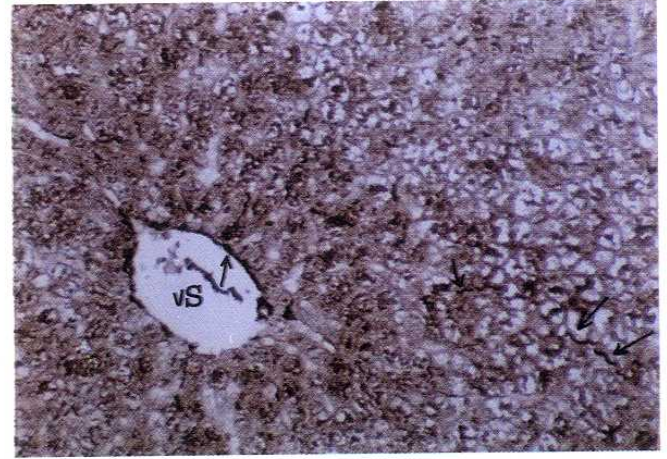
mg/kg all-trans retinoik asit verilen deneklere göre daha az şiddetli olduğu izlendi. Bu gruba ait deneklerde de yine portal alan çevresinde sitoplazmaları boya almamış hepatositlere rastlandı. Ancak etkilenen alan daha az yer kaplamaktaydı. Yine portal alan çevresinde sinuzoid yapıları belirgin değildi. Bu grupta damar içi hücre yoğunlaşması gözlemlenmedi. Ayrıca Kupffer hücre infiltrasyon alan-



Şekil 5. Deney grubuna ait karaciğer dokusunun PAS ile boyanması sonucunda, portal alan çevresindeki hepatositlerin PAS (-) (tek oklar) olduğu, diğer hepatositlerin ise PAS (+) (çift oklar) reaksiyon verdiği görülmekte. Ayrıca damar içinde kan hücrelerinin arttığı izlenmekte (*). Periodic acid Schiff x 10



Şekil 6. 40 mg / kg all-trans retinoik asid verilen deney grubunda boyanmamış hücreler arasında Kupffer hücre infiltrasyon odakları (oklar) artmış olarak görülmekte. Boyanmamış ve şişmiş olan hepatositler (h) arasındaki sinuzoid yapıları seçilememekte. Hematoksilen – Eosin x 20



Şekil 8. 20 mg / kg all-trans retinoik asid verilen deney grubunda ise vena sentralis (vs) çevresinde ve hepatositler arasında retikülm ipliklerinin (oklar) daha az yoğun olarak boyandığı görülmekte. Gümüşleme x 20

larına seyrek olarak rastlanıldı. PAS ile yapılan boyamalarda her iki deney grubunda da portal alan çevresindeki hepatositler boya almazken, v. sentralis çevresindeki hepatositlerde PAS ile boyanma tespit edildi (Şekil 5). Yüksek doz A vitamininin kollagen lifler üzerine olan etkileri Masson'un üçlü boyası ile incelendi ve gruplar arasında fark gözlenmedi. Kontrol grubu denekler ile 20 mg/kg all-trans retinoik asid verilen deneklerin karaciğer lobüllerindeki retiküler lif boyanması benzerlik gösterirken 40 mg/kg all-trans



Şekil 7. 40 mg / kg all-trans retinoik asid verilen deney grubunda vena sentralis (vs) çevresinde ve hepatositler arasında retikülm ipliklerinin (oklar) yoğun boyandığı görülmekte. Gümüşleme x 20

retinoik asid verilen grupta retiküler ipliklerin daha yoğun boyandığı gözlemlendi (Şekil 7, 8).

TARTIŞMA

Vücutta retinoidlerin %90'ından fazlası karaciğerde depo edilmektedir. Bu miktarın %80'ini İto hücrelerinde geri kalan kısmı ise karaciğerin parankimal hücrelerinde (hepatositlerde) depolanmaktadır. Kupffer hücrelerinde de az miktarda retinoidlere rastlandığı bildirilmektedir (8).

Yüksek dozda alınan A vitamini karaciğerde perisinuzoidal fibrozis (14,15), hücre ölümü ve siroz gibi onarılmaz bozukluklara, karaciğer sinuzoidlerinde dilatasyona ve portal alan çevresinde yangı reaksiyonuna yol açmaktadır (14). Shintaku T ve arkadaşları yüksek dozda A vitamini enjeksiyonunu takiben hepatik lobüllerin periferel zondaki hepatositlerde fokal nekrozun meydana geldiğini tespit etmişlerdir (16). Yüksek doz A vitamini hepatositlerde yapısal bozukluğa yol açmasının yanısıra (10,13), Kupffer hücrelerini aktive etmekte (13,15), yağ depolayan hücrelerde lipid birikmesine sebep olmaktadır. Bunlara ilaveten karaciğer lobüllerinde metabolik heterojeniteye neden olmaktadır (13).

Bu çalışmada da toksik doz vitamin A'dan lobüllerin özellikle periferel zondaki hepatositlerin etkilendiği görüldü. Sentral ven çevresinde yer alan hepatosit sitoplazmaları boya alırken, portal alan

çevresinde yer alan hepatosit sitoplazmalarının boya almadığı saptandı. Bu duruma paralel olarak karaciğer dokusunda heterojen bir yapı gözlemlendi. Yapılan PAS boyaması sonucunda da periferel zondaki hücrelerin boyanmaması belirgin olarak izlenirken vena sentralis çevresindeki hücreler PAS (+)'lik göstermekteydi. PAS (+)'lik göstermeyen periferel zon hücrelerinde glikojen miktarının oldukça azaldığı düşünülüyor. Yine A vitamininin dozunun artışına paralel olarak karaciğer lobüllerinde Kupffer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Karaciğer sinuzoidlerinde genişleme görülmedi. Tersine portal alan çevresinde şişkin olan ve sitoplazması boya almayan hepatositlerin bulunduğu bölgelerde sinuzoidler belirgin değildi. Bu yapısal değişiklikler 40 mg/kg all-trans retinoik asit verilen deneklerde daha şiddetli düzeyde gözlemlendi.

Vishnevskaja EK. Yüksek doz A vitamininin retiküler fibril yoğunluğunda artışa neden olduğunu belirtmektedir (15). Bu çalışmada da özellikle 40 mg/kg/gün all-trans retinoik asit verilen deneklerin karaciğer lobüllerinde retiküler iplik boyanmasının kontrol ve 20 mg/kg all-trans retinoik asit verilen gruplar ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada verilen yoğun dozlardaki A vitamininin karaciğerde oldukça toksik etki yaptığı, hepatositlerin yapılarında bozulmalara yol açtığı, hepatik lobüllerde heterojen bir yapının oluşmasına sebep olduğu söylenebilir. Bu toksik etkiler, verilen A vitamininin miktarındaki artışa paralel olarak ciddiyet kazanmaktadır. Bu konuda yapılacak olan elektron mikroskopik çalışmalar hepatositlerde, İto ve Kupffer hücrelerinde meydana gelen yapısal değişiklikleri daha detaylı bir şekilde gösterecektir.

KAYNAKLAR

1. Nau H. Retinoid teratogenesis : Toxicokinetics and structure-specificity. Arch Toxicol 1993; 16: 118-27.
2. Pike RL, Brown ML. Nutrition : An integrated Approach, 2nd ed. New York : John Wiley and Sons; 1975 : p. 145 -6.
3. Bendich A, Langseth L. Safety of vitamin A. Am J Clin Nutr 1989; 49: 358 -71.
4. Tzimas G, Bürgin H, Collins MD, Humler H, Nau H. The high sensitivity of the rabbit to the teratogenic effects of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) is a consequence of prolonged exposure of the embryo to 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxo-retinoic acid and not of isomerization to all-trans-retinoic acid. Arch Toxicol 1994; 68 (2) : 119 -28.
5. Moore KL, Persaud TVN. The developing human, 5th ed. Philadelphia WB. Saunders company; 1993: p. 162 -3.
6. Tsamboas D, Hundeiker M, Mahrle G, Orfanos CE. Reversible impairment of spermatogenesis induced by aromatic retinoid in guinea pigs. Arch Dermatol Res 1980; 267 (2) : 153-9.
7. Schutte B, Kuhlwein A. Effect of aromatic retinoid on spermatogenesis in rats. Light microscopy findings in the testes. Z Hautkr 1983 ; 58 (7) : 439-55.
8. Makoto S, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M. Intravital and electron microscopic observation of ito cells in rat hepatic microcirculation. Microvasc Res 1993; 46, 28-42.
9. Leo MA, Lieber CS. Hypervitaminosis A: A liver lover's lament. Hepatology 1988 ; 8 : 412-7.
10. Farrell GC, Bhathal PS, Powell LW. Abnormal liver function in chronic hypervitaminosis A. Am J Dig Dis 1977; 22 (8) :724-8.
11. Kudo S. The morphology of release of vitamin A-containing lipid droplets by hepatocytes in rat liver. Anat Rec 1989 ; 225 (1) : 11-20.
12. Donoghue S, Kronfeld DS, Ramberg CF Jr. Plasma retinol transport and clearance in hypervitaminosis A. J Dairy Sci 1979 ; 62 (2) : 326-32.
13. Lettinga KD, Gutter W, Van Noorden CJ, Schellens JP. Early effects of high doses of retinol (vitamin A) on the in situ cellular metabolism in rat liver. Liver 1996 ; 16 (1) : 1-11.
14. Baker H, Hove W, Kanagasundaram N, Zaki G, Leevy CB, Frank O. Case Report : Excess vitamin A injures the liver. J Am Coll Nutr 1990 ; 9 (5) : 503-9.
15. Vishnevskaja EK. The effect of the prodigiosan stimulation of Kupffer cells on the development of perisinusoidal fibrosis in experimental hypervitaminosis A. Morfologija 1996 ; 110 (5) : 91-5.
16. Shintaku T, Murata T, Yamaguchi K, Makita T. Hepatic hystopathology of a vitamin A overdose in mouse liver. J Electron Microsc 1998 ; 47 (3) : 263 -7.