



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2011; 25 (1): 05 – 09
http://www.fusabil.org

Neriman ÇOLAKOĞLU¹
Aysel KÜKNER²
Enver OZAN¹
Haki KARA³
Leyla KOYUTÜRK¹
Tuncay KULOĞLU¹

¹Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı
Elazığ, TÜRKİYE

²Abant İzzet Baysal
Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı
Bolu, TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi,
Elazığ Sağlık Yüksekokulu
Elazığ, TÜRKİYE

Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum Klorür'ün Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Metallothionein'nin Etkileri: Elektron Mikroskopik Çalışma

Amaç: Bu çalışmada, testiküler dokuda kadmiyum klorürün sebep olduğu yapısal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine koruyucu amaçla uygulanan metallothioneinin etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç Yöntem: 36 adet erişkin Wistar rat 3 gruba ayrıldı. Birinci gruba (n:16) 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür subkutan yolla enjekte edildi. İkinci grup ratlara (n:16) ise 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür subkutan yolla ve metallothionein (30 µmol/kg/gün) intraperitoneal yolla birlikte enjekte edildi. Üçüncü grup ratlar (n: 4) kontrol olarak kullanıldı. Deneysel çalışmanın 1., 3., 5. ve 7. günlerinde eter anestezisi altında testiküler doku örnekleri 2.5% 'luk glutaraldehit solusyonuna alınarak tespit edildi. Elektron mikroskopik incelemeler için bloklar hazırlandı.

Bulgular: Elektron mikroskopik incelemelerde, kadmiyum klorür enjeksiyonunun özellikle 3. gününden sonra şiddetli doku hasarı gözlemlendi. Bu hasar deneyin ilerleyen günlerinde giderek artmaktaydı. Kadmiyum klorür toksikasyonu sonucunda testis dokusunda interstisyel alanda kollagen artışı, leydig hücrelerinde mitokondri artışı, spermatogonik hücrelerde lipid birikimi ve apoptozis tespit edildi. Benzer yapısal değişiklikler kadmiyumla birlikte koruyucu amaçla metallothioneinin enjekte edilen grupta da gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmanın sonucunda kadmiyumun, testis dokusunda oldukça ciddi yapısal bozukluklar meydana getirdiği saptandı. Uzun süre kadmiyum maruziyetinin infertiliteye sebep olan ciddi hasarlar oluşturabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, testis, metallothionein, mikroskop.

Structural Changes Induced by Cadmium Chloride and Effects of Metallothionein on These Changes in Rat Testicular Tissue: An Electron Microscopic Study

Objective: This study was undertaken to investigate cadmium chloride-induced structural changes and the probable protective effects of co-administration of metallothionein in the testicular tissue.

Material Methods: Thirty-six adult Wistar rats were divided in to three groups. Cadmium chloride (3.5mg/kg/day) was subcutaneously injected to the first group (n: 16) whereas second group of rats (n:16) received both cadmium chloride (3.5mg/kg/day) and metallothionein (30µmol/kg/day, ip). The 3rd group (n:4) used as control. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day of experimental study, testicular tissue samples were taken under ether anesthesia and fixed with 2.5% glutaraldehyde then prepared blocks for electron microscopic examination.

Results: On the electron microscopic examination, particularly after the 3rd day of injection of cadmium chloride, severe tissue damage was evident. The damage gradually increased relative to the time of administration of cadmium chloride. It was determined that cadmium chloride led to collagen increase in the interstitial field, lipid accumulation and apoptosis in the spermatogenic cells increase of mitochondria in the Leydig cells. Similar structural changes were observed in the group that was co-administered metallothionein for protection.

Conclusions: As a results, cadmium chloride caused serious structural damage in the testicular tissue. Long term exposure to cadmium chloride may give rise to infertility.

Key Words: Cadmium, testes, metallothionein, microscopy.

Giriş

Ağır bir metal olan kadmiyum major çevresel toksik ajanlardan biridir. Genel insan popülasyonu kadmiyuma, kontamine içme suları ve yiyeceklerle ve ayrıca maden endüstrisinde çalışan insanlar da mesleki olarak maruz kalırlar. Madenlerin eritilmesi ve işlenmesi gibi endüstriyel aktivitelerle kadmiyum, atmosfere kadmiyum oksit, klorid veya sülfid olarak salınmaktadır.

Geliş Tarihi : 04.02.2011
Kabul Tarihi : 07.03.2011

Yazışma Adresi Correspondence

Neriman ÇOLAKOĞLU
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ-TÜRKİYE

nerimancoolakoglu@yahoo.com

Havadaki ~ 0.04 µg/m³, içme suyundaki 1 µg/l ve daha düşük seviyelerdeki kadmiyum tehlike arz etmemektedir. Bir insan günde ortalama ~ 1 µg/gün yiyecekler yoluyla, 1-3 µg/gün sigara yoluyla kadmiyum absorbe etmektedir (1).

Kadmiyumun böbrek, prostat, karaciğer ve pankreası içeren birçok organda kanserojenik etki gösterdiği bildirilmektedir. Son yıllarda ulusal ve uluslararası ajanslar insanların kadmiyuma maruz kalmasını kontrol altına alıp en düşük düzeylerde tutmak için büyük çaba sarfetmektedirler. Bununla beraber kadmiyum insan vücudunda oldukça uzun süren yarılanma ömrüne sahiptir ve böbrek ve karaciğer başta olmak üzere bütün vücutta birikme eğilimi göstermektedir. Kadmiyumun hızlı komponenti vücutta 75-128 günlük yarılanma ömrüne sahipken, yavaş komponenti 7.4-26 yıl gibi uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir (2).

Kadmiyum vücutta absorbe olduktan sonra albumine bağlanarak karaciğere gelir ve karaciğerde sisteinden zengin ağır metal bağlayan bir protein olan metallothioneinin (MT) sentezini indükler. MT'ye bağlı kadmiyum karaciğerden plazmaya geçer ve idrar ile atılır (2).

MT; kadmiyum, civa gibi ağır metallerin detoksifiye edilmesinde, çinko ve bakır gibi esansiyel metallerin homeostazisinde rol oynar. Ayrıca hücre içi oksidatif hasara karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (3, 4). Bir metalloprotein olan MT hücrede sitosol, nükleus, lizozom ve mitokondrinin membranları arasında tespit edilmiştir (5). MT transkripsiyonu ağır metaller (6, 7), ionize radyasyon ve oksidatif stres tarafından indüklenmektedir (7). Ağır metalleri bağlayan bir protein olarak bilinen MT'nin testislerde de bulunduğu ve sahip olduğu sistein rezidüleri ile çinko, bakır, ve kadmiyum gibi ağır metallere bağlanarak detoksifikasyonda görev aldığı rapor edilmektedir (8, 9). MT'nin önemli aktiviteleri sadece metal iyonlarının homeostazisi ile sınırlı değildir. Aynı zamanda hücresel yaşamın uzaması, metabolik aktivite, doku rejenerasyonu ve apoptotik ve inflamatuvar cevapların bloke edilmesi gibi önemli fonksiyonları vardır (5).

Biz bu çalışmada *in vivo* şartlarda organizmada sentezlenen ve ağır metalleri detoksifiye etmesiyle bilinen bir metalloprotein olan MT'nin ekzojen olarak uygulanmasının kadmiyumla oluşturulan testis hasarına karşı koruyucu olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

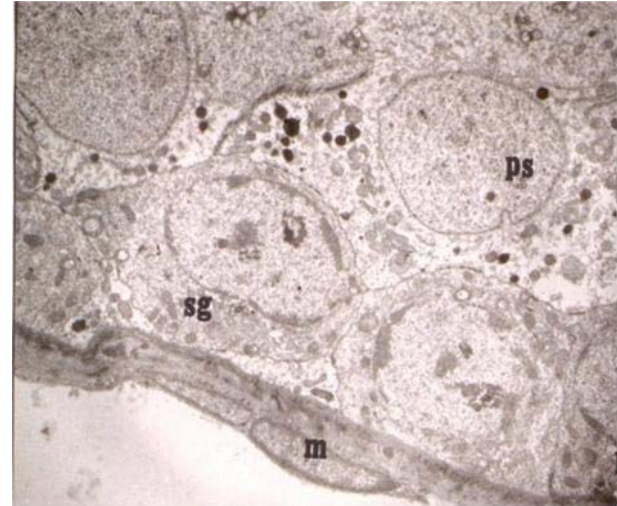
Gereç ve Yöntem

Çalışmada 36 adet Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanlara (n:16) deri altı yolla 3.5mg/kg/gün kadmiyum klorür, ikinci grup sıçanlara(n:16) deri altı yolla 3.5mg/kg/gün kadmiyum klorür ile birlikte periton içi 30µmol/kg/gün metallothionein enjekte edildi. Üçüncü grup sıçanlar (n:4)

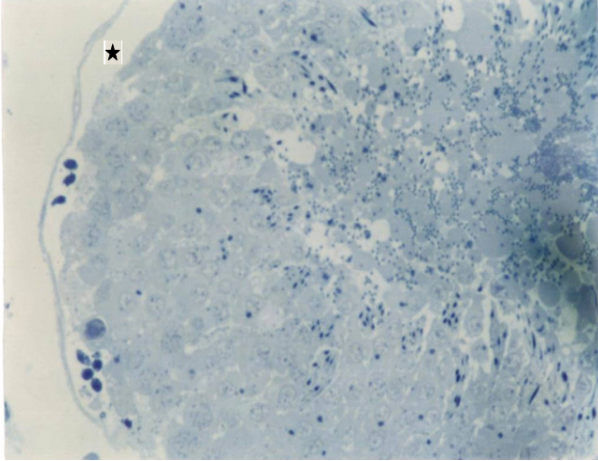
ise kontrol olarak kullanıldı. Kadmiyum klorür ve MT uygulamasının 1., 3., 5. ve 7. günlerinde deneklerden eter anestezisi altında testis dokuları alındı, %2.5'lük glutaraldehit solüsyonunda tespit edildi. Elektron mikroskop takip serilerinden geçirildi ve Araldit Cy212+DDSA+BDMA karışımına gömüldü. İnce ve yarı ince kesitler alınarak Zeiss 9S2 elektron mikroskop ve Olympus BH2 fotomikroskop ile incelenerek görüntülendi.

Bulgular

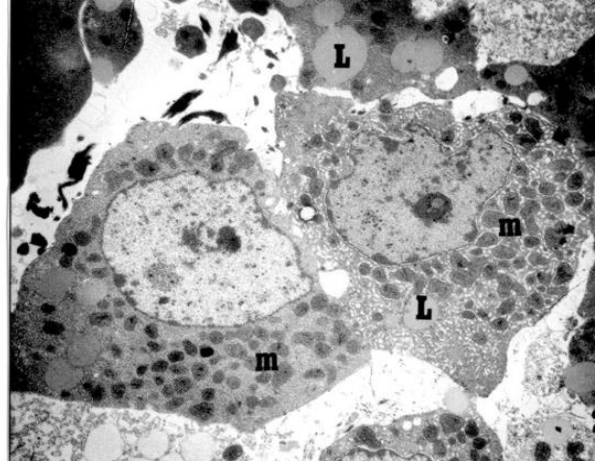
Kontrol grubunda seminifer tübül, spermatogenik hücreler ve interstisyel hücreler normal yapıda (Şekil 1) gözlenirken, kadmiyum enjeksiyonundan 1 gün sonra incelenen testis dokularında interstisyel bölgede minimal kollagen artışı ve bazı seminifer tübüllerin bazal membranlarından ayrıldığı saptandı (Şekil 2). Kadmiyum klorür enjeksiyonundan üç gün sonra spermatogenik hücrelerin sınırlarının ve organellerinin tanımlanmasının güç olduğu, oldukça heterokromatik nükleusa sahip oldukları ve interstisyel alanda kollagen artışının olduğu saptandı. Lipid birikimi belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 3). Leydig hücrelerinde mitokondri artışı, genişlemiş düz endoplazmik retikulum yapıları ve lipid birikimi tespit edildi (Şekil 4). Kadmiyum uygulamasının 5. ve 7. günlerinde benzer patoloji gözlemlendi. Bu gruplarda seminifer tübüllerdeki hücrelerin sınırlarının ve organellerin seçilemediği, apoptotik görünümlü çok sayıda hücre ve interstisyel bölgede kollagen ve lipid artışı dikkat çekiciydi (Şekil 5, 6). Kadmiyum toksisitesine karşı metallothionein uygulanan gruplarda da apoptotik görünümlü hücreler, lipid birikimi ve fazla miktarda kollagen lif demetleri saptandı (Şekil 7).



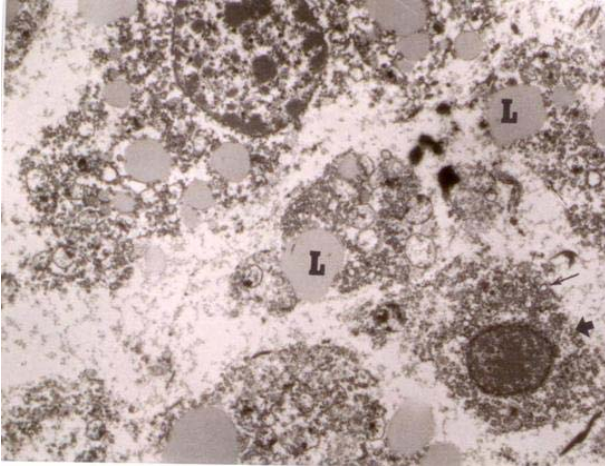
Şekil 1. Kontrol grubu. Seminifer tübül duvarında yer alan spermatogonia (sg), primer spermatosit (ps) ve peritübüler myoid hücre (m) gözlenmektedir. Kurşun Sitrato-Uranil Asetat. Orijinal büyütme x 3000.



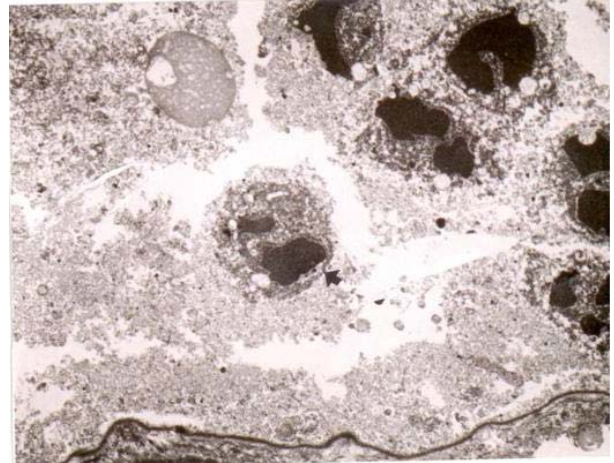
Şekil 2. Grup I. Kadmiyum uygulanişından 1 gün sonra. Seminifer tübülün bazal membrandan ayrıldığı (*) ayırt edilmekte. Toluidin Mavisi x 240.



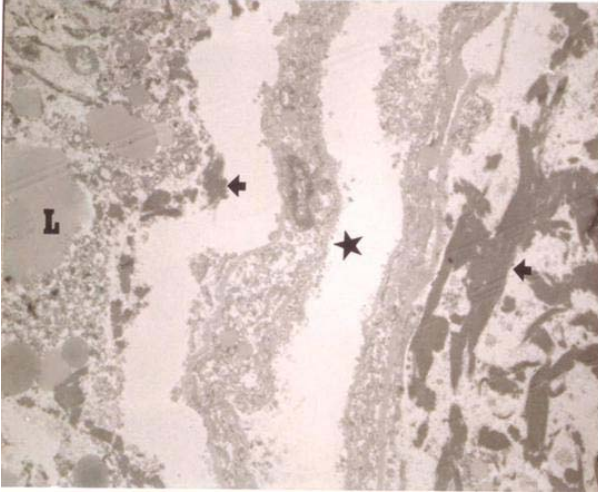
Şekil 4. Grup I. Kadmiyum uygulanişından 3 gün sonra. Leydig hücrelerinde mitokondri artışı (m), genişlemiş SER yapıları ve lipid damlacıkları (L) ayırt edilmekte. Kurşun Sitrata- Uranil Asetat. Orijinal büyütmeye x 3000.



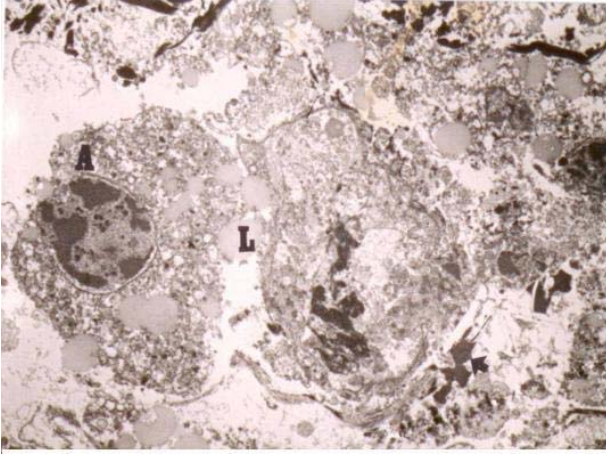
Şekil 3. Grup I. Kadmiyum enjeksiyonundan 3 gün sonra. Hücreler arası sınırların belirgin olmadığı, apoptotik görünümlü hücreler (kalın ok), hücrelerde veziküler yapılar (ince ok) ve lipid birikimi (L) dikkat çekmekte. Kurşun Sitrata- Uranil Asetat. Orijinal büyütmeye x 3000.



Şekil 5. Grup I. Kadmiyum enjeksiyonundan 5 gün sonra. Seminifer tübül içinde apoptotik hücreler (ok), hücreler arası sınırların belirgin olmadığı izlenmekte. Kurşun Sitrata- Uranil Asetat. Orijinal büyütmeye x 3000.



Şekil 6. Grup I. Kadmiyum enjeksiyonundan 7 gün sonra. Düzensiz seminifer tübül (*), lipid birikimi (L) ve interstisyel alanda kollogen (ok) ayırt edilmekte. Kurşun Sitrat- Uranil Asetat. Orijinal büyütme x 3000.



Şekil 7. GrupII. Kadmiyum ve metallothionein enjeksiyonundan 7 gün sonra. Apoptotik Leydik hücresi (A), karyorektik hücre, lipid damlacıkları (L) ve kollogen (ok). Kurşun Sitrat- Uranil Asetat. Orijinal büyütme x 3000.

Tartışma

Kadmiyum, çok sayıda doku için toksiktir. Akut kadmiyum zehirlenmesinde pulmoner ödem, hemoraji, fulminant hepatitis, testiküler hasar gözlenirken, uzun süreli kadmiyum maruziyetinde nefrotoksisite, osteotoksisite ve immünotoksisiteden bahsedilmektedir (10).

Testisler kadmiyumun önemli hedef organlarından. Kadmiyum uygulaması sonucunda akut stres durumunda açığa çıkan cytoplasmic Myc protein (C-myc) ve early growth response 1(Egr-1) ekspresyonunda artış olurken

DNA-tamir genlerinin ve başta Caspase 3 (Casp3) olmak üzere proapoptotik genlerin ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durumda kadmiyumun karsinogenezisi indüklediği düşünülebilir (11).

Testis kadmiyuma karşı oldukça duyarlıdır. Kadmiyum kan-testis bariyerini bozmakta germ hücrelerinde kayıba, ödem, hemoraji ve nekrozise sebep olup sonuçta infertiliteyle sonuçlanan sağlık problemlerine yol açmaktadır (1).

Akut ve kronik kadmiyum uygulaması erkek sıçanlarda kan testosteron düzeyini düşürmektedir. İntratestiküler kadmiyum enjeksiyonun; spermatogenezisi geçici olarak duraklattığı, spermatozoa konsantrasyonunu düşürdüğü ve anormal yapıli sperm sayısını artırdığı rapor edilmektedir. Yine balık testislerinde germinal zon üzerinde toksik etkiler doğurduğu, kemiricilerde Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları bozarak kan-testis bariyerini hasara uğrattığı ve spermatogenezis hücrelerinde yapısal bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (12).

Kusakabe T ve arkadaşları yaptıkları çalışmada intraperitoneal kadmiyum enjeksiyonundan 24 saat sonra seminifer tübüllerin bazal membranlarından ayrıldığını, atrofiye uğradığını ve spermatogenezis hücrelerin önemli derecede azaldığını ve ayrıca interstisyel dokunun bozulduğunu tespit etmişlerdir. Yine bu araştırmacılar kadmiyum enjeksiyonundan 6 saat sonra seminifer tübüllerin bütün bölümlerinde güçlü MT ekspresyonunun olduğunu gözlemlemişler. Kadmiyum enjeksiyonundan 12 saat sonra MT ekspresyonu seminifer tübüllerin bütün bölümlerinde zayıf olarak ayırt edilirken 24 saat sonra ise ciddi testiküler hasardan dolayı tübüllerin periferinde MT ekspresyonu belirlenememiştir (8).

Yapılan bu çalışmada kadmiyum enjeksiyonunun özellikle 3. günden sonra artan şiddette interstisyel bölgede kollogen artışı, seminifer tübüllerin bazal membranlarından ayrılması, spermatogenezis hücrelerin organellerinde hasar ve hücrelerarası sınırlarının belirgin olmayışı ayırt edildi. Yine apoptotik görünümlü çok sayıda hücre ve hücrelerde lipid birikimi gözlendi. Benzer bulgulara kadmiyumla birlikte koruyucu amaçla MT uyguladığımız deneklerimizde de rastladık.

Sonuç olarak kadmiyumun, testis dokusunda oldukça ciddi yapısal bozukluklar meydana getirdiği, uzun süre kadmiyum maruziyetinin infertilite gibi ciddi hasarlar oluşturabileceği söylenebilir. Normal şartlarda organizmada sentezlenen ve ağır metalleri bağlayıp detoksifiye edilmesinde görev yapan MT'nin ekzojen olarak uygulanmasının ise koruyucu bir etki oluşturmadığı sonucuna varıldı. Bu sonuç bize kullanılan MT dozunun tedavi için yetersiz olduğunu veya invivo olarak organizmanın sentezlediği MT'nin sentetik olarak uygulanan MT'den daha güçlü bir terapötik etkiye sahip olduğunu düşündürdü.

Kaynaklar

1. Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238 (3): 240-9.
2. Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol.* 2008; 25 (3): 304-15.
3. Imagawa M, Onozawa T, Okumura K, Osada S, Nishihara T, Kondo M. Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* 1990; 268 (1): 237-40.
4. Moilanen LH, Fukushige T, Freedman JH. Regulation of metallothionein gene transcription. Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 1999; 274 (42): 29655-65.
5. Swindell WR. Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Res Rev.* 2011; 10 (1): 132-45.
6. Simoniello P, Motta CM, Scudiero R, Trinchella F, Filosa S. Cadmium-induced teratogenicity in lizard embryos: correlation with metallothionein gene expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011; 153 (1): 119-27.
7. Ye B, Rui Q, Wu Q, Wang D. Metallothioneins are required for formation of cross-adaptation response to neurobehavioral toxicity from lead and mercury exposure in nematodes. *PLoS One.* 2010; 5 (11): 1-12.
8. Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Koyama H, Arakawa K, Nagamine T. The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals* 2008; 21 (1): 71-81.
9. Kusakabe T, Nakajima K, Nakazato K, Suzuki K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Arakawa K, Nagamine T. Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol In Vitro.* 2008; 22 (6): 1469-75.
10. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238 (3): 215-20.
11. Zhou T, Jia X, Chapin RE, Maronpot RR, Harris MW, Liu J, Waalkes MP, Eddy EM. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol Lett.* 2004; 154 (3): 191-200.
12. Leoni G, Bogliolo L, Deiana G, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, Ledda S, Naitana S. Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol.* 2002; 16 (4): 371-77.