

Kadmiyum Klorürün Sıçan Böbrek Dokusunda Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Metallothioneinin Etkileri: Işık Mikroskopik Çalışma

STRUCTURAL CHANGES INDUCED BY CADMIUM CHLORIDE AND EFFECTS OF METALLOTHIONEIN ON THESE CHANGES IN RAT KIDNEY TISSUE: A LIGHT MICROSCOPIC STUDY

Dr. Haki KARA,^a Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU,^b Dr. Aysel KÜKNER,^c Dr. Enver OZAN^b

^aFırat Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu,

^bHistoloji Embriyoloji AD, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, ELAZIĞ

^cHistoloji Embriyoloji AD, Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi, BOLU

Özet

Amaç: Bu çalışmada kadmiyum klorür uygulaması ile böbrek dokusunda meydana gelen yapısal değişiklikler ve kadmiyum klorür ile birlikte ekzojen uygulanan metallothioneinin koruyucu etkilerinin ışık mikroskopik incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada 36 adet Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanlara (n: 16) deri altı yolla 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür (Sigma; St Louis MO, USA), ikinci grup sıçanlara (n: 16) deri altı yolla 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür ve periton içi 30 µmol/kg/gün metallothionein (Sigma; St Louis MO, USA) enjekte edildi. Üçüncü grup sıçanlar (n: 4) ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Çalışmanın 1., 3., 5. ve 7. günlerinde deneklerden eter anestezisi altında böbrek dokuları alındı, %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi, parafin bloklar hazırlandı. Alınan kesitlere (5 µm) Hematoksilin & Eosin, Periodic acid Schiff ve Masson'un üçlü boyaları uygulandı.

Bulgular: Bu çalışmada her iki deney grubunda da kadmiyum klorür ve metallothionein uygulama süresinin artışına paralel olarak renal korpuskül ve tübüllerin bazal membranlarında kalınlaşma, proksimal tübüllerde dejenerasyon, korteksteki damarlarda konjesyon saptandı. İkinci grupta ayrıca intramesangial hücrelerde artış, tübüllerde PAS (+) granüller ve kortiko medullar bölgedeki tübüllerde PAS (+) hiyalin madde birikimi gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak kadmiyum klorür'ün böbrekler için oldukça toksik olduğu ve önemli yapısal hasara yol açtığı belirlendi. Metal bağlayan protein olarak bilinen metallothioneinin oluşan bu yapısal hasarları önlemede yetersiz kaldığı ve benzer yapısal bozuklukların metallothionein uygulanan gruplarda da oluştuğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, metallothionein, böbrek, mikroskop

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:592-597

Geliş Tarihi/Received: 05.01.2004

Kabul Tarihi/Accepted: 01.07.2004

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji AD, 23119 ELAZIĞ
nerimancolakoglu@yahoo.com

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Abstract

Objective: The aim of present study was to determine by light microscopy the cadmium chloride-induced structural changes and protective effects of co-administration of metallothionein in kidney tissue.

Material and Methods: Thirty-six adult Wistar male rats were used in this study. Animals were divided into three groups. Cadmium chloride (3.5 mg/kg/day) was subcutaneously (s.c) injected to the first group (n= 16), whereas the second group (n= 16) received both cadmium chloride (3.5 mg/kg/day s.c) and metallothionein (30 µmol/kg/day intraperitoneally). The rats in the third group (n= 4) were used as controls. On the 1st, 3rd, 5th and 7th days of the study, kidney tissue samples were taken under ether anesthesia and fixed with 10% formaldehyde solution and prepared in paraffin blocks. Tissue sections (5 µm) were stained with Hematoxylin & Eosin, Periodic Acid Schiff and Masson's trichrom.

Results: Kidney tissue damage including basal membrane thickening of the renal corpuscule and tubules, degeneration in the proximal tubules and vascular congestion in the renal cortex were observed in both experimental groups dependent time. Moreover, in the second group, an increase in intramesangial cells, PAS (+) granules in the tubules and, in the corticomedullar tubules, an accumulation of PAS (+) hyaline substance was observed.

Conclusion: It was determined that cadmium chloride has a toxic effect in kidneys and causes serious structural damage. Metallothionein, known as a metal-binding protein, proved insufficient in preventing cadmium chloride-induced damage.

Key Words: Cadmium, metallothionein, kidney, microscope

Oldukça toksik ağır bir metal olan kadmiyumun çevresel miktarında son birkaç yüzyıl içinde önemli artış olduğu bildirilmektedir.¹ Özellikle karaciğer ve böbrek dokularında biriken kadmiyum, hücrelerde

apoptozisi indüklemekte ve aynı zamanda nekroza yol açmaktadır.² Nefropati, kronik kadmiyum toksikasyonunun insanda meydana getirdiği rahatsızlıklardan en bilinenidir.¹ Kadmiyumun oluşturduğu nefropati proteinüri, aminoasidoüri ve glikoz-üri gibi klinik semptomlar göstermektedir.^{1,3} Kadmiyum böbreklerde özellikle proksimal tübül hücrelerinde toksik etki göstermektedir.⁴ Kanda kadmiyum miktarının artışı glomeruler filtrasyonda azalmaya yol açmaktadır.⁵ Ovariectomi yapılan sıçanlarda kadmiyumun neden olduğu renal hasarın şiddetinde artış olduğu rapor edilmiştir.⁶

Kadmiyum; DNA, RNA ve protein sentezini inhibe etmekte, karbonhidrat metabolizmasını ve mikrozomal sitokromların içeriğini değiştirmektedir.⁴ Konneksinlerin ekspresyonunu azaltarak hücrelerarası iletişimi sağlayan gap junction'ların inhibisyonuna sebep olmaktadır.⁷

Metal bağlayan bir protein olan metallothionein (MT)'in sentezi birçok metal tarafından indüklenmektedir. Bu proteinin hücre içi çinko ve bakır depolanmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Kadmiyum, MT'nin sentezini uyaran metallerden biridir. Kadmiyum toksisitesine karşı bu proteinin koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir. Yapılan doku kültürü çalışmalarında düşük dozda uygulanan kadmiyumun MT salgılattığı ve daha sonra uygulanan letal dozdaki kadmiyuma karşı direnç geliştirdiği bildirilmektedir.⁸

Bu çalışmada böbreklerde kadmiyum klorür

uygulanması ile meydana gelen yapısal değişiklikler üzerine ekzojen uygulanan MT'nin etkisinin ışık mikroskopik incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler

Deneye başlamadan önce Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı ve "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensiplerine uyularak hayvan haklarının korunması ile ilgili gereken titizlik gösterildi. Çalışmada 36 adet Wistar cinsi ergin erkek sıçan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanlara (n: 16) deri altı yolla 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür (Sigma; St Louis MO, USA), ikinci grup sıçanlara (n: 16) deri altı yolla 3.5 mg/kg/gün kadmiyum klorür ile birlikte periton içi 30 µmol/kg/gün MT (Sigma; St Louis MO, USA) enjekte edildi.⁹ Üçüncü grup sıçanlar (n: 4) ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Kadmiyum klorür ve MT uygulamasının 1., 3., 5. ve 7. günlerinde deneklerden eter anestezisi altında böbrek dokuları alındı, %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi ve ışık mikroskopik takip serilerinden geçirilip, parafin bloklar hazırlandı. Alınan 5 µm'lik kesitlere Hematoksilen & Eosin, Periodic acid Schiff ve Masson'un üçlü boyaları uygulandı. Kesitler Olympus BH2 fotomikroskopta incelenip fotoğraflandı. Deneye bağlı olarak böbrek dokusunda meydana gelen histopatolojik bulguların gruplar arasındaki farklılığı semiquantitative analiz

Tablo 1. Kadmiyum klorür ve kadmiyum klorür ile birlikte MT uygulamasını takiben böbrek dokusunda meydana gelen histopatolojik değişikliklerin şiddetinin deney süresine bağlı olarak skorlanması.

| Histopatolojik değişiklikler | Kontrol | Kadmiyum Klorür Günler | | | | Kadmiyum Klorür + MT Günler | | | |
|----------------------------------|---------|---------------------------|----|----|-----|--------------------------------|----|----|-----|
| | | 1 | 3 | 5 | 7 | 1 | 3 | 5 | 7 |
| RK ve tübüllerde BM kalınlaşması | - | - | - | + | ++ | - | - | + | ++ |
| İntramezengial hücre artışı | - | - | - | + | + | - | + | + | ++ |
| PTD'da dilatasyon ve konjesyon | - | - | - | ++ | +++ | - | - | ++ | +++ |
| KMT'de PAS (+) hiyalin madde | - | - | - | - | - | - | + | + | ++ |
| PT'de vakuolizasyon | - | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Tübüllerde PAS (+) granül | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ |
| PT'de bazofilik boyanmada azalış | - | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ |

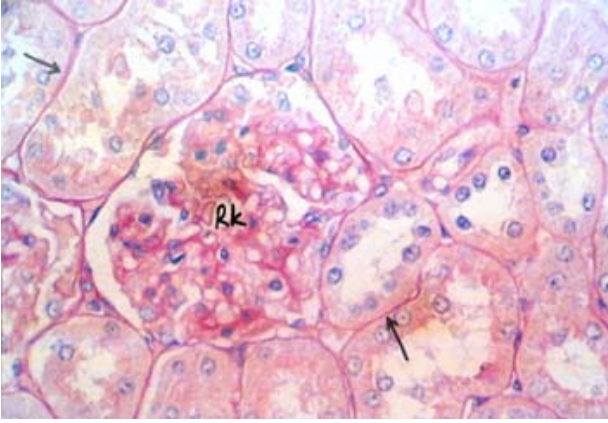
RK: Renal korpüskül, BM: Bazal membran, PTD: Peritübüler damarlar, KMT: Kortikomeduller tübül, PT: Proksimal tübül yapılarını; histopatolojik değişiklikler yönünden -: Yok; +: Hafif derecede; ++: Orta derecede; +++: Şiddetli derecede meydana gelen yapısal değişiklikleri ifade etmektedir.

ile Tablo 1'de gösterildi.

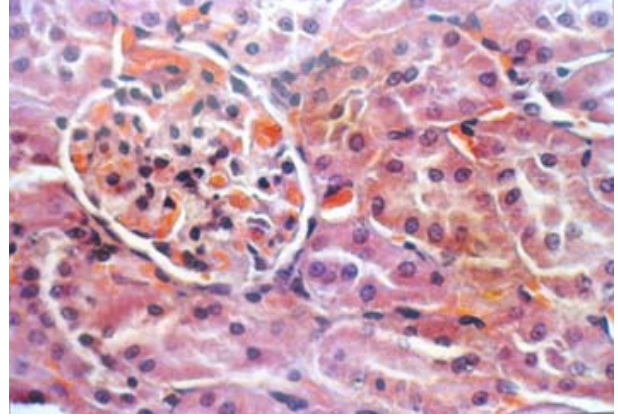
Bulgular

Deney süresince kadmiyum klorür toksisitesine bağlı olarak sıçanlarda ölüm olayı gerçekleşmedi. Kadmiyum klorür ve MT enjeksiyonu tamamlandıktan sonra eter anestezisi altında abdominal bölgeye yapılan midsagital insizyon ile alınan böbrek dokularının makroskopik incelenmesi sonunda her iki deney grubunda da konjesyon gözlemlendi. Mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait olan kesitlerde renal korpuskül (RK),

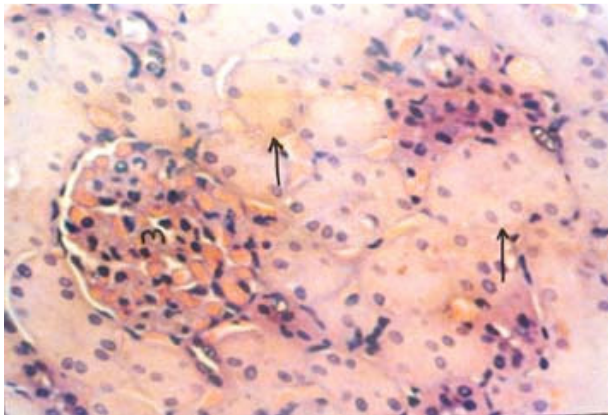
tübül yapıları ve bazal membran kalınlıkları normal olarak izlendi (Şekil 1). Birinci ve ikinci gruplarda deneyin 1. günündeki böbrek yapısı kontrol grubuna benzer şekilde görüldü (Şekil 2). Kadmiyum klorür ve kadmiyum klorür ile birlikte MT uygulamasının 3. gününde proksimal tübüllerde, dejenerasyon belirtisi olduğu düşünülen bazofilik boyanmada azalma, MT uygulanan grupta ayrıca RK'ların çoğunda intramezengial hücrelerde artış saptandı (Şekil 3, 4). Deneyin 5. gününde 1. ve 2. gruplarda yapısal bozulukların belirginliği devam etmekteydi. Önceki bulgulara ilaveten her iki grupta da peritübüler



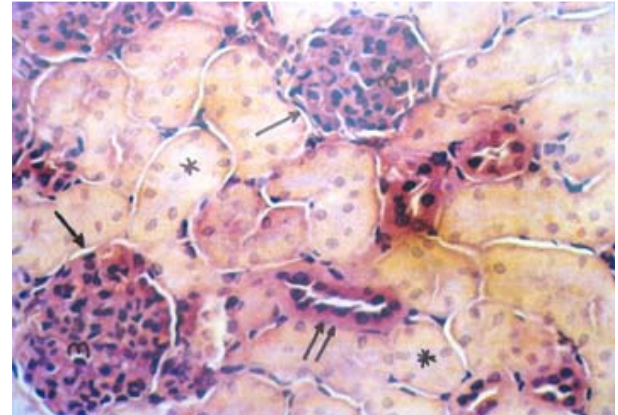
Şekil 1. Kontrol grubu. RK ve tübül yapıları (ok) normal olarak izlenmekte. Periodic acid Schiff x 20.



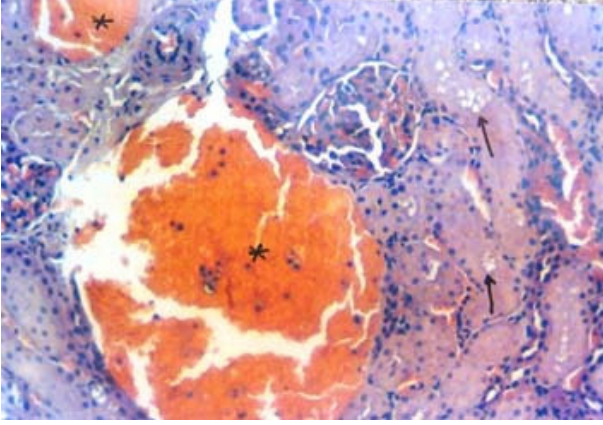
Şekil 2. Kadmiyum klorür uygulamasının 1. günü. RK ve tübül yapıları kontrol grubuna benzer olarak ayırt edilmekte. Hematoksilen Eozin x 20.



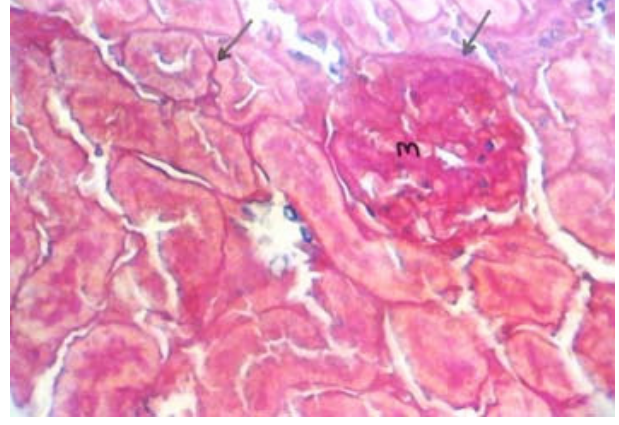
Şekil 3. Kadmiyum klorür uygulamasının 3. günü. RK'da mezangium artışı (m), proksimal tübüllerin lumenlerinin kapalı olduğu ve soluk boyandığı (ok) izlenmekte. Hematoksilen Eozin x 20.



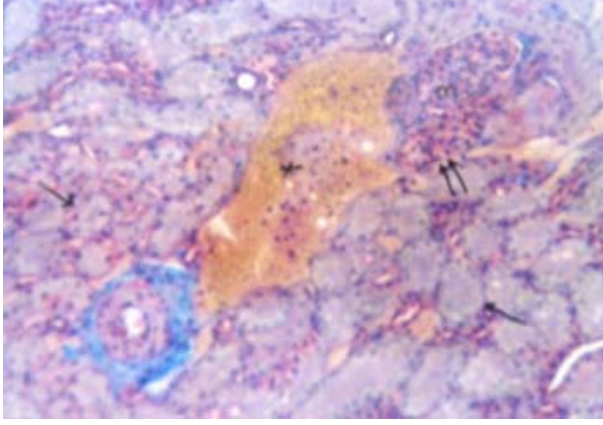
Şekil 4. Kadmiyum klorür ile birlikte MT uygulamasının 3. günü. RK'da mezengial hücrelerde artış (m), Bowman aralığında belirgin daralma (ok), proksimal tübüllerde dejenerasyon (*), gözlenmekte. Distal tübüller (çift ok) normal yapıda ayırt edilmekte. Hematoksilen Eozin x 20.



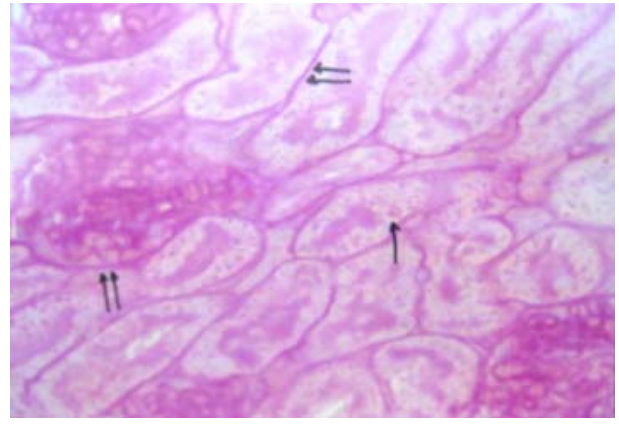
Şekil 5. Kadmiyum klorür uygulamasının 7. günü. Tübüller arası kan damarlarında genişleme ve konjesyon (*), proksimal tübül-lerde vakuolizasyon (ok) izlenmekte. Hematoksilen Eozin x 10.



Şekil 6. Kadmiyum klorür uygulamasının 7. günü. RK'da mezengium artışı (m), tübül ve RK bazal membranlarında kalınlaşma (ok) dikkat çekmekte. Periodic acid Schiff x 20.

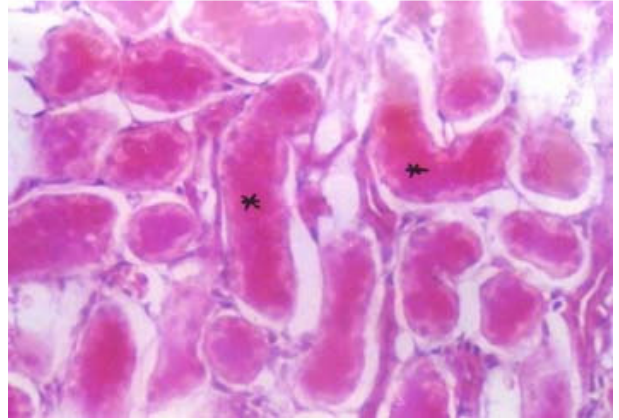


Şekil 7. Kadmiyum klorür ve MT uygulamasının 7. günü. RK'da intramezangial hücre artışı (m), Bowman aralığında daralma (çift ok), soluk boyanan tübüller (ok) ve tübüller arasındaki kan damarlarında genişleme ve konjesyon (*) ayırt edilmekte. Mallory'nin üçlü boyası x 10.



Şekil 8. Kadmiyum klorür ve MT uygulamasının 7. günü. RK ve tübüllerin bazal membranlarındaki kalınlaşma (çift ok) ve tübüllerde PAS (+) granüler yapılar (ok) belirgin olarak gözlenmekte. Periodic acid Schiff x 20.

damarlarda dilatasyon ve konjesyon, proksimal tübüllerde vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RK ve tübüllerin bazal membranlarında PAS (+)'lık şiddetinde artış dolayısıyla bazal membran kalınlaşması belirgin olarak saptandı (Şekil 6). Kadmiyum klorür ve MT'nin birlikte uygulamasının 7. gününde prok-simal tübül dejenerasyonu, intramezangial hücrelerde yoğunlaşma, konjesyone ve genişlemiş peritübüler damarlar, bazal membran kalınlaşması ve tübüllerde PAS (+) granüler yapılar ayırt edildi (Şekil 7, 8). Kadmiyum klorür ve MT'nin birlikte uygulandığı gruplarda deneyin 3. gününden itibaren özellikle kortikomeduller bölgedeki



Şekil 9. Kadmiyum klorür ve MT uygulamasının 7. günü. Kortikomeduller bölgedeki tübüllerde PAS (+) hiyalin madde birikimi (*) ayırt edilmekte. Periodic acid Schiff x 20.

tübüllerde PAS (+) hiyalin madde birikimi saptandı (Şekil 9). Deney sonunda I. ve II. gruplara ait böbreklerdeki etkilenmenin özellikle 3. günden itibaren başladığı tespit edildi (Tablo 1).

Tartışma

Birçok endüstri sahasından çevreye salınan ağır metallere biri olan kadmiyum sindirim kanalı ile alındıktan sonra böbreklerde birikip renal hasara yol açmaktadır.¹⁰ Uzun süreli kadmiyum maruziyetinin, proksimal tübüllerde atrofiye, dejenerasyon ve vezikülasyona sebep olduğu bildirilmektedir.^{11,12} Akut ve kronik kadmiyum toksikasyonunda proksimal tübül hücrelerinde apoptozis, mikrovillus yapılarında bozulma, mitokondriyonlarda şişme gözlenirken, RK'ların podosit ve pedisellerinde füzyon meydana gelmektedir.¹³ Kadmiyum miktarının artışına paralel olarak renal kortekste nekrotik değişiklikler oluşmaktadır.¹²

Gallien ve ark. kadmiyum konsantrasyonu böbrek korteksinde 50µg/g'a ulaştığında tübül fonksiyon bozukluğunun meydana geldiğini bildirmektedirler.¹³ Kadmiyuma bağlı olarak proksimal tübüllerde vakuolizasyon, lizozom artışı, RK'ların bazal membranlarında kalınlaşma, mikrocisimlerde ve düz endoplazmik retikulum organellerinde artış, çekirdekte inklüzyonlar tespit edilmiştir.^{4,14}

Yapılan bu çalışmada da kadmiyum klorür uygulamasının böbrek dokusunu etkilediği saptandı. Kadmiyum uygulama süresinin artışına paralel olarak önem kazanan RK ve tübüllerin bazal membranlarında kalınlaşma, proksimal tübüllerde dejenerasyon ve vakuolizasyon, kortekste tübüller arasındaki damarlarda genişleme ve konjesyon gözlemlendi.

Ağır metalleri bağlayıp detoksifikasyon sürecinde etkili oldukları bildirilen MT'ler en yoğun olarak karaciğer ve özellikle de böbreklerde sentezlenmektedirler.¹⁵ MT'nin ayrıca esansiyel iz elementlerinin homeostazisinde, birçok hastalığın tedavisinde rol oynadığı ve değişik oksidatif stres koşullarına karşı koruyucu olduğu bildirilmektedir.¹⁶

Bu çalışmada kadmiyumun oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla kullanılan MT'nin böbrek dokusunu koruyamadığı saptandı. Kadmiyum ile birlikte MT uygulamasının 3. gününden itibaren RK'larda mezengium artışı, proksimal tübüllerde dejenerasyon, tübüller arası damarlarda dilatasyon ve konjesyon, tübüllerin ve RK'ların bazal membranlarında kalınlaşma ve özellikle kortikomeduller bölgedeki tübüllerde yoğun olmak üzere bütün tübüllerde PAS (+) hiyalin madde birikimi tespit edildi. Ayrıca sadece kadmiyum verilen gruplardan farklı olarak deneyin 7. gününde renal kortekste tübüllerde PAS (+) granüler yapılar saptandı. Bu granüllerin metal detoksifikasyonunda rol oynuyor olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak hem kadmiyum klorür hem de kadmiyum klorür ile birlikte MT uygulanmasının sıçan böbrek fonksiyonlarını etkileyebilecek derecede yapısal bozukluklara yol açtığı saptandı. Birçok zararlı maddeyi detoksifiye etmesiyle bilinen ve biyosentezi karaciğer ve böbrekler tarafından yapılan MT'nin ekzojen uygulamasının kadmiyumun sebep olduğu yapısal değişikliklere karşı koruyucu etki oluşturmadığı tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Rehm S, Waalkes MP. Acute cadmium chloride-induced renal toxicity in the Syrian hamster. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;104:94-105.
2. Kim SC, Cho MK, Kim SG. Cadmium induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulphhydryl deficiency. *Toxicol Lett* 2003;144 (3):325-36.
3. Min KS, Kobayashi K, Onosaka S, Ohta N, Okada Y, Tanaka K. Tissue distribution of cadmium and nephropathy after administration of cadmium in several chemical forms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;86:262-70.
4. Matsuura K, Takasugi M, Kunifuji Y, Horie A, Kuroiwa A. Morphological effects of cadmium on proximal tubular cells in rats. *Biol Trace Elem Res* 1991;31(2):171-82.
5. Agirdir BV, Bilgen I, Dinç O, Ozcaglar HU, Fisenk F, Turhan M. Effect of zinc ion on cadmium-induced auditory changes. *Biol Trace Elem Res* 2002;88(2):153-63.
6. Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J, Tsuchitani M, Umemura T, Marumo F. Ovariectomy enhances cadmium-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;119(2):267-74.

7. Jeong SH, Habeebu SS, Klaasen CD. Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver. *Toxicol Sci* 2000;57:156-66.
8. Gooyer RA, Miller CR, Zhu S, Victory W. Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;101:232-44.
9. Kara H, Servi K. Farelerde kadmiyumun akut ve kronik toksisitesi üzerine bazı steroid yapılı maddelerin etkisinin araştırılması. *FÜ Sağ Bil Derg* 1999;13(3):249-58.
10. Khodja H, Avoscan L, Carriere M, Carrot F, Gouget B. Investigation of cadmium toxicity on renal epithelial cells using nuclear microprobe analysis. *Nuc Inst Method Phys Res B* 2003;210:359-63.
11. Bompert G, Orfila C, Manuel Y. Cisplatin nephrotoxicity in cadmium-pretreated rats. *Nephron* 1991;58:68-74.
12. Chmielnicka J, Halatek T, Jedlinska U. Correlation of cadmium-induced nephropathy and the metabolism of endogenous copper and zinc in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 1989;18:268-76.
13. Gallien I, Caurant F, Bordes M, et al. Cadmium-containing granules in kidney tissue of the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) off the Faroe Island. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;130:389-95.
14. Hamada T, Tanimoto A, Iwai S, Fujiwara H, Sasaguri Y. Cytopathological changes induced by cadmium exposure in canine proximal tubular cells: A cytochemical and ultrastructural study. *Nephron* 1994;68:104-11.
15. Filipovic V, Raspor B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic sea. *Water Res* 2003;37:3253-62.
16. Tandon SK, Singh S, Prasad S, Mathur N. Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food Chemical Toxicol* 2001;39:571-7.