

## Akut testiküler kadmiyum intoksitesinin fizyopatolojisinde serbest radikallerin yeri

Ahmet SEREL\*, Hakan GEMALMAZ\*, Alim KOŞAR\*, Namık DELİBAŞ\*\*, Gülsen AYDIN\*\*\*

\* Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı,

\*\*Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,

\*\*\*Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı..

### ÖZET

Yirmidört erkek Wistar rata 21 gün süre ile 1 mg/ml kadmiyum klorid intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna ise 20 erkek Wistar rat alındı. Kadmiyum verildikten 21 gün sonra tüm ratlar sakrifiye edildiler. Testiküler antioksidan enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz), kadmiyum düzeyleri ve malondialdehid düzeylerinin belirlenmesi amacı ile tüm ratların testisleri çıkarıldı (MDA). Ayrıca testisler histopatolojik olarak değerlendirildi. Kadmiyum verilen ratlarda testiküler antioksidan enzim aktiviteleri ve malondialdehid düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ( $p<0.05$ ). Ayrıca kadmiyum verilen ratlarda testiküler hasarı gösteren patolojik bulgular elde edildi. Sonuçta kadmiyuma bağlı olarak ortaya çıkan testiküler hasarın fizyopatolojisinde peroksidatif hasar ve lipoperoksidasyonun rol oynayabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, testiküler hasar, lipoperoksidasyon.

### SUMMARY

Twenty-four male Wistar strain rats were injected 1 mg/ml of cadmium chloride intraperitoneally for 21 days and 20 male rats were considered as controls. At the end of 21 days all rats were sacrificed to determine antioxidant enzyme (superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase) activities and malondialdehyde levels of testis (MDA). Testis cadmium levels were determined by atomic absorption spectrophotometry. The histopathological changes in the testis were also noted. In the cadmium-treated group, the antioxidant enzyme activities and the MDA levels were found to be increased when compared with control group. There was a statistically significant difference between two groups ( $p<0.05$ ). All the cadmium-treated rats showed pathological testicular alterations. Our results suggested that peroxidative damage and lipoperoxidation might be responsible for the physiopathology of cadmium-induced testicular damage.

Key Words: Cadmiuam, testicular damage, lipo peroxidation.

### GİRİŞ

Kadmiyumun testiküler toksiteye yolaçarak fertilitite bozukluğu yaptığı öteden beri bilinmektedir. Bu toksitesini testislerde çeşitli enzimatik, histolojik ve morfolojik özellikleri bozarak yaptığı sanılmaktadır (1,2). Fakat kadmiyuma bağlı testiküler hasarın fiz-

yopatolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Akut kadmiyum toksitesi yüksek oranda kadmiyum içeren besinlerin alınması ile meydana gelebilir (13). Gouveia ve arkadaşları akut kadmiyum intoksikasyonunun testiküler hasara yolaçtığını ratlarda deneysel olarak göstermişlerdir (4).

Haberleşme Adresi: Dr. T. Ahmet SEREL, SDÜ. Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 32040 ISPARTA

Geliş tarihi : 18.12.1996

Kabul tarihi : 25.12.1996

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KA) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler (AOE) bütün memeli hücrelerinde bulunurlar. Bunlar hücreleri serbest radikal hasarından korurlar. Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren reaktif moleküllerdir. Bu moleküller hücre içerisinde lipidler, proteinler veya DNA ile etkileşerek sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir dizi olayı başlatırlar (5,6). Prohaska ve arkadaşları kadmiyum toksitesinin testiküler GPx aktivitesinde bir yükselmeye neden olduğunu göstermişlerdir (7).

Bu çalışmada, biz akut kadmiyum intoksitesinin testiküler antioksidan enzim sistemi üzerine olan etkisini araştırmayı ve bunun kadmiyuma bağlı olarak ortaya çıkan testis hasarının fizyopatolojisindeki önemi ortaya koymayı amaçladık.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışma ağırlıkları 185 ve 300 gr arasında değişen Wistar albino erkek ratlar üzerinde yapıldı. Hayvanların yaşadığı ortam çevre sıcaklığı  $22.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$  arasında değişmekte olup, gürültüden uzak ve 12 saatlik sirkadiyan ritme uygun olarak hazırlanmış idi. Ratlar 4 adetlik kafeslere yerleştirildiler. Yirmi rat kontrol grubu olarak tutulurken, 24 rata 1 mg/ml kadmiyum klorid intraperitoneal olarak sabah 8:00 ve 9:00 saatleri arasında 21 gün süre ile enjekte edildi. Bu dozun daha önce yapılan bir pilot çalışmada LD50 olduğu tespit edilmişti. Kontrol grubuna ise sadece izotonik enjekte edildi. Bütün ratlar uygun miktarda yiyecek ve su ile beslendiler.

Yirmibir gün sonra tüm ratlar ketamin anestezisi altında öldürüldü ve testisleri çıkarıldı. Testislerden bir tanesi antioksidan enzim (AOE) aktivitesi ve kadmiyum düzeyi ölçümü için ve diğer testisleri histopatolojik inceleme için ayrıldılar. Testiküler AOE aktivite ölçümü için testisler bekletilmeden soğuk izotonik ile yıkandılar ve  $-20^\circ\text{C}$  de saklandılar. Her rata ait 1 gram testis dokusu ayrı ayrı fosfat tampon solüsyonu ile (1: 10 w/v) (0.01 M, pH=7.4) homojenize edildi. Takiben karışım 2000 rpm devirde

10 dakika süre ile santrifüj edildi. Oluşan supernatant plastik tüplerde ağızları kapatılarak  $-70^\circ\text{C}$ 'de derin dondurucuda biyokimyasal ölçümler yapılmaya dek saklandı. Bütün biyokimyasal analizlerde standart spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Purifiye enzim standartları Randox (UK) şirketinden elde edildi. AOE aktivitesi ölçümleri ünite/mg protein olarak verildi.

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi 240 nm de renk değişikliğine yol açarak parçalar. Bir katalaz enzim ünitesi 1 nmole hidrojen peroksidi 1 dakikada dekompoze eden mg protein miktarıdır. SOD aktivitesi epinefrinin 480 nm de otooksidasyonunun inhibiyonu ile ölçüldü. Epinefrin otooksidasyonunun % 50'sini inhibe eden miktarı 1 ünite olarak tanımlanır. GPx aktivitesi NADPH'nin 340 nm deki oksidasyonu ile ölçüldü. Bir GPx enzim aktivitesi 1 nmole NADPH'yi 1 dakikada okside eden mg protein olarak tanımlandı.

MDA düzeyi tiyobarbitürik asid (TBA) methodu ile ölçüldü (8). Lipoperoksidlerin hidrolizi ile oluşan MDA TBA ile etkileşerek MDA-TBA bileşimini oluşturur. Bu bileşik 532 nm de renk değişikliğine yol açar. Bu çalışmada MDA düzeyi nmole MDA/kuru testis ağırlığı olarak verilmiştir.

Testis proteini ise Lowry methodu ile tayin edildi (9).

Kadmiyum düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile ölçüldü. Histopatolojik inceleme için alınan testis örnekleri kadmiyum seviyesinin tesbitinde kullanıldı. Kadmiyum seviyesi Saygı ve arkadaşlarının (10) tarif ettiği yöntemle yapıldı. Sonuçlar  $\mu\text{g}$  cadmium/gr yaş ağırlık olarak verildi.

Histopatolojik inceleme için testisler formalin ile fikse edildi ve parafinlendi. Örnekler Hematoxyline-Eosin (H-E) ile boyandılar.

Gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık eşiği olarak  $p < 0.05$  kabul edildi.

## SONUÇLAR

İntraperitoneal kadmiyum verilen ratlardaki or-

Tablo 1. Kadmiyumun kontrol ve çalışma grubundaki rat testlerinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine olan etkisi.

	Kadmiyum	Kontrol	P
SOD* (U/mg protein)	35.8±2.3	12.3±1.2	p<0.05
KA** (U/mg protein)	47.4±5.1	14.8±2.3	p<0.05
GPx*** (U/mg protein)	51.4±1.7	27.4±3.1	p<0.05

\* Superoksit dismutaz \*\* Katalaz \*\*\* Glutasyon peroksidaz

talama AOE aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı bulunan bir yüksekliğe sahipti. SOD aktivitesi kadmiyum verilen grupta 35.8±2.3 ve kontrol grubunda 12.3±1.2 şeklinde idi (p<0.05). KA aktivitesi kadmiyum grubunda 47.4± ve kontrol grubunda 14.8±2.3 idi (p<0.05). GPx aktivitesi kadmiyum grubunda 51.4±1.7 ve kontrol grubunda 27.4±3.1 şeklinde idi (p<0.05) (Tablo 1).

Tablo 2. Rat testislerindeki ortalama MDA düzeyleri

	MDA (nmole/kuru ağırlık)
Kontrol	0.25±0.02
Kadmiyum	4.8±0.5
P değeri	p<0.05

Tablo 2'de ortalama testiküler MDA düzeyleri görülmektedir. MDA düzeyleri kadmiyum grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunan bir yüksekliğe sahip idi (p<0.05). Kadmiyum grubunda ortalama testiküler kadmiyum düzeyi ise 0.210±0.018 olarak ölçüldü. Kontrol grubunda herhangi bir yükseklik tesbit edilmedi.

Hispatolojik incelemede makroskopik olarak kadmiyum verilen ratların testislerinde boyutlarda küçülme, küçük sarı bir renk dikkati çekiyordu. Mikroskopik olarak testiküler atrofi, tubulus nekrozu, intertisiyumda fibrozis ve vasküler trombozis dikkati çekiyordu. Tubulusların bazılarında vasküler hiperemi ve intertubuler alanlarda hemoraji odakları vardı. Tunika albugineada kalınlaşma dikkati çekiyordu. Kontrol grubunda ratların testislerinde herhangi bir patolojik bulgu dikkati çekmedi.

## TARTIŞMA

Çevresel veya çevresel olmayan faktörlerle kadmiyuma maruz kalmanın erkek hayvanlarda ve erkek insanlarda fertilitate yeteneğini etkileyen toksik etkilere yol açtığı bilinmektedir (10,11). Ancak kadmiyumun yolaçtığı testiküler hasarın biyokimyasal mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılmamış olup, araştırmaya açıktır.

Testis kadmiyum toksitesinde bir hedef organ olarak kabul edilmektedir. En önemli toksik etkisi spermilerin fertilizasyon kapasitesini bozmaktır (12). Kadmiyum testiste kapiller endotelyuma tutunarak kan-testis bariyerinin bozulmasına yol açan bir dizi olayı başlatarak testiküler hücrelere ulaşır (13).

Kadmiyum intoksikasyonunun fizyopatolojisini ortaya koymak için yapılan deneysel hayvan çalışmaları sınırlı sayıdadır. Prohaska ve Chung (7,14) kadmiyum verildikten sonra ratlarda testiküler GPx aktivitesinin artmış olduğunu tesbit etmişlerdir. Sugawara ve arkadaşları kadmiyuma bağlı olarak ortaya çıkan testiküler hemorajiye lipid peroksidasyonundaki bir artışın eşlik ettiğini göstermişlerdir (15). Maines ve arkadaşları ise kadmiyum verilen ratlarda lipoperoksidasyonun endojen hemen yıkılması ile açığa çıkan demir ile hızlandığını tesbit etmişlerdir (16). Biz elde ettiğimiz sonuçlara göre kadmiyum verilen ratlarda sadece GPx aktivitesinde değil tüm antioksidan enzim aktivitelerinde bir yükselme olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca lipoperoksidasyonun bir göstergesi olan testiküler MDA düzeyleri kontrol grubuna göre an-

lamli olarak yüksekti. Vücutta serbest radikallerin aşırı miktara ulaşmalarını ve toksik etkilerini "endogen scavenger" adı verilen bir takım maddeler önlerler. Bu maddeler enzimik ya da non-enzimik olabilirler. Öte yandan serbest radikallerin hücrede harabiyet oluşturma mekanizmalarından biri de hücre membran lipidleri üzerinde lipoperoksidasyona yol açarak hücre hasarına yol açabilmeleridir (17). Antioksidan enzimler serbest radikal hasarını önleme kapasitesine sahiptirler. Biz çalışmamızda tesbit ettiğimiz AOE aktivitesi yüksekliğinin kadmiyumun neden olduğu testiküler hasar sonucu aşırı derecedeki serbest radikal oluşumuna karşı koruyucu bir cevap olarak ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Diğer taraftan kadmiyum grubunda gözlenen anlamlı derecedeki MDA yüksekliği ise testiküler serbest radikal hasarının lipoperoksidasyon yolu ile gerçekleştiğine dikkati çekmektedir.

Histopatolojik olarak Saygı ve arkadaşlarının yaptığı orijinal hayvan çalışmasında kadmiyuma kronik olarak maruz kalmanın testiküler hasara yol açtığı gösterilmiştir (10). Ayrıca Gouveia intraperitoneal olarak kadmiyum verilmesini takiben 14 gün sonra testiküler hasar oluştuğunu göstermiştir (4). Buna göre bizim patolojik bulgularımız değerlendirildiğinde testislerin kadmiyum etkisine karşı çok hassas olduğu ve akut dönemde testiküler hasara yol açabildiği dikkati çekmektedir. Mikroskobik bulgularımız ise hemorajiden tubuler nekroza ve vasküler trombozdan tubuler atrofiye kadar gidebilen geniş bir spektrum göstermektedir.

Sonuç olarak biz akut kadmiyum intoksikasyonunun testiküler hücrelerde aşırı miktarda serbest radikal oluşumuna neden olduğunu, ayrıca gelişen testiküler hasardan serbest radikallerin meydana getirdiği lipoperoksidasyonun sorumlu olduğunu düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Louria DB, Joselow MM, Browder AA. The human toxicity of certain trace elements. *Ann Intern Med* 1972; 76: 307-19.
2. Ragan HA, Mast TJ. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. *Rev Environ Contam Toxicol* 1990; 117: 1-21.
3. Nordberg GF. Cadmium metabolism and toxicity. *Environ Physiol Biochem* 1972; 2: 7-36.
4. Gouveia MA. The testes in cadmium intoxication: Morphological and vascular aspects. *Andrologia* 1988; 20: 225-31.
5. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease-free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-6.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine; some problems and concepts (review). *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
7. Prohaska JR, Mowafy M, Ganther HE. Interactions between cadmium, selenium, and glutathione peroxidase in rat testis. *Chem Biol Interact* 1977; 18: 253-8.
8. Andersen HJ, Chen H, Pellett LJ, Tappel AL. Ferrous-iron-induced oxidation in chicken liver slices as measured by hemichrome formation and thiobarbituric acid-reactive substances: Effects of dietary vitamin E and beta-carotene. *Free Radic Biol Med*. 15: 37-48. 1993.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Clin Chem* 1951; 193: 265-75.
10. Saygı Ş, Gönen D, Kutsal O, Nevin V. Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis and fertility of male rats. *Biol Trace Element Res* 1991; 31: 209-14.
11. Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR. Reproductive and developmental toxicity of metals. *Scand J Work Environ Health* 1985; 11: 145-54.
12. Berlin M, Lee IP, Russel LD. Effects of metals on male reproduction In: Reproductive and developmental toxicity of metals (Clarkson TW, Nordberg GF and Sager PR Eds) New York: Plenum Press, 1983, 27-40.
13. Wong KL, Klaassen CD. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxic Appl Pharmac* 1980; 55: 456-63.
14. Chung An-S, Maines MD. Differential effect of cadmium on GSH peroxidase activity in the leydig and the sertoli cells of rat testis. *Biochem Pharmac* 1987; 36: 1367-72.
15. Sugawara N, Sugawara C. Selenium protection against testicular lipid peroxidation from cadmium. *J Appl Biochem* 1984; 6: 199-24.
16. Maines MD, Chung AS, Kutty RK. The inhibition of testicular heme oxygenase activity by cadmium. A novel cellular response. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257 (23): 14116-21.
17. Salvemi D, Botting R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *TIPS* 1993; 14: 36-42.