

FÖTAL VE NEONATAL DÖNEM FARELERDE DENEYSSEL KADMIYUM TOKSİKASYONUNUN PATOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

Gülçin ÖZTÜRK¹ Fethi YILMAZ²

¹Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Elazığ-TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Sivrice Meslek Yüksekokulu, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.06.1998

Pathological Observation of Experimentally-Induced Cadmium Toxication in Foetal and Neonatal Mouse Pups

SUMMARY

In this study, pathological examination was carried out in neonatal and suckling mice taken Cadmium (Cd) from their mother. For this aim, 2.5 mg/kg and 5 mg/kg Cd were added to drinking water of mother mice before and during gestation and lactation periods. These periods were about 60 days. Neonatal and suckling mice of two group were necropsied at the end of these periods. No macroscopic lesions were observed. Degeneration and necrosis of hepatocytes were observed in mice in the group I treated with 2.5 mg/kg Cd. In addition to these findings, megalocytosis in the liver were recorded in mice of the group II treated with 5 mg/kg Cd. Neuronal degeneration in the brain were seen in all experimental groups. Additional findings were hyperemia and epithelial degeneration of tubulus in the kidney in suckling mice. On the other hand, these microscopic lesions were more prominent in mice of the group which were treated with 5 mg/kg Cd.

Key Words: Mouse pups, Cadmium, Experimental toxication, Pathology

ÖZET

Bu çalışmada, intrauterin hayatta kan yolu ile ve süt emme dönemlerinde süt ile annelerinden kadmiyum (Cd) almaları sağlanarak, yavru farelerde Cd'un toksik etkileri patolojik yönden incelendi. Bu amaçla, deneme grubu dişi farelere gebelik öncesi, gebelik dönemi ve yavruların süt emme döneminde olmak üzere yaklaşık 60 gün boyunca içme suları ile 2.5 mg/kg ve 5 mg/kg olmak üzere iki ayrı dozda Cd verildi. Her iki deneme grubunda doğan yavruların bir kısmı doğumdan hemen sonra, kalan yavruların ise yaklaşık 18-20 gün kadar sürdüğü bilinen süt emme dönemlerinin tamamlanmasından sonra nekropsileri yapıldı. Makroskobik olarak herhangi bir bulgu görülmedi. Mikroskobik muayenede ise; 2.5 mg/kg Cd alan farelerden elde edilen yavru farelerde karaciğerde; dejenerasyon, nekroz; 5 mg/kg dozda Cd alan farelerin yavrularında ise bu bulgulara ilaveten megalositozis; ayrıca her iki grupta beyinde nöronal dejenerasyon gözlemlendi. Süt emme dönemini tamamlayanlarda ise, bu bulgulara ilaveten böbreklerde; hiperemi ve tubulus epitellerinde dejenerasyon dikkati çekti. Her iki dönem yavru farelerdeki bulguların özellikle 5 mg/kg Cd verilen grupta daha şiddetli olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Yavru fare, Kadmiyum, Deneysel toksikasyon, Patoloji

GİRİŞ

Sülfhidril gruplarına ilgi gösteren Cd metalinin bazı enzimlerin inhibisyonuna, demir eksikliğine bağlı anemiye ve hipertansiyona yol açtığı ifade edilmektedir (20). Bunun yanında pankreasın beta hücrelerinin sekresyonunu azaltması sonucu

hiperglisemiye, nükleik asitlere affinitesi sonucu tümörlerle, özellikle yeni doğanlarda sinir sistemi hasarına ve pek çok doku ve organda patolojik değişikliklere neden olmaktadır (4,7,12,14,20,22).

Günlük hayatta gelişen teknoloji ile birlikte, pek çok ürün ile kullanıma giren Cd, insan ve hayvan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Doğada kurşun ve çinko maden filizleriyle birlikte bulunan Cd, bu metallerin işlendiği fabrikalar civarında sürekli bir kirlilik yaratmaktadır. Ayrıca çeşitli metal alaşımları ve pigmentlerin yapısına da giren Cd'un, laboratuvar hayvanlarında altlık olarak kullanılan başta talaş olmak üzere diğer materyallerin genel bir kontaminantı olduğu bilinmektedir. (2,11,16,20). Kadmiyum ile kontamine bölgelerde et,süt,yumurta gibi hayvansal ürünlerde varlığının yanısıra, annelerden süt ile geçen Cd'a bağlı olarak yavruların çeşitli dokularında da bu metalin varlığı bildirilmektedir (6,16,18,19).

Bileşik şekline, alınış yoluna, dozuna ve hayvan türüne bağlı olmak üzere organizmada farklı bozukluklara yol açtığı pek çok çalışma ile ortaya konulmuştur. Lansdown ve Sampson (11), rat ve farelerde yaptıkları deneysel çalışmalarında, kadmiyum kloridin 10 gün süreyle deriye uygulanması sonucu hiperkeratosiz ve parakeratosiz şekillendiğini, epitelde mitotik aktivitenin arttığını gözlemlemişlerdir. Cd' un enzim aktivitesindeki inhibisyona bağlı olarak kemiklerden Ca salınımını arttırması ile ilgili olarak Carlsson ve Lundholm (3)'un yaptıkları çalışmada, neonatal dönemde farelerden alınan kemik doku kültüründe, 0.4-0.8 µMol Cd uygulamasıyla kemiklerdeki Ca salınımının büyük artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu durum özellikle Japonya' da kadmiyumla ilgili endüstri dallarında çalışan işçilerde gözlenen kronik zehirlenmeye bağlı olarak şekillenen osteomalasi ve spontan kemik kırılmalarının görüldüğü İtai-itai hastalığında da açıktır (20).

Böbrek, karaciğer ve testis gibi pek çok organ ve doku üzerinde önemli bir toksin olduğu bilinen kadmiyum, sinir sisteminde de önemli patolojik değişimlere neden olmaktadır (1,4,8,15,20,22). Kadmiyum-metallothionein (Cd-MT) bileşiminin kan yoluyla böbreklerde birikimi, özellikle kronik Cd toksikasyonunda tahribata yol açmaktadır. Tek doz Cd verilmesi durumunda Cd-MT' nin kandan hızla temizlenmesi ve böbreklerde biriken Cd' un indirgediği renal MT sayesinde böbrek tahribatı reverzibl olabilmektedir (4).

Bu çalışmada gebelik süresince Cd toksikasyonuna maruz bırakılan farelerden elde edilen yavruların ve süt emme dönemini tamamlayan yavru farelerin Cd' dan etkilenip etkilenmedikleri patolojik yönden ortaya konulmaya çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Deney Hayvanı ve Kimyasal Madde: Çalışmada, iki deneme ve bir kontrol olmak üzere üç grup fare kullanıldı. Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü deney hayvanı ünitesinden temin edilen Swiss albino fareler ayrı bölmelerde ve normal bakım ve yemleme koşullarında barındırıldı. Her grupta 10'ar olmak üzere toplam 30 adet, yaklaşık 20 g ağırlığında, 6 haftalık dişi fareler seçildi. Gebeliği takiben doğan ve süt emme dönemini tamamlayan fareler çalışmada kullanıldı.

Cd kaynağı olarak Kadmiyum klorid ($CdCl_2 + 2H_2O$ (Merck)) kullanıldı.

Uygulama: Çalışmada kullanılan dişi farelere deneme süresince (yaklaşık 60 gün), günlük su tüketimlerinin yaklaşık 8 ml kadar olduğu saptanarak, Grup I'e 2.5 mg/kg/gün ve Grup II'ye 5 mg/kg/gün dozda Cd içme suları ile verildi. Kontrol grubu farelerin ise normal su tüketimleri sağlandı. Çalışmanın yaklaşık 21.gününe kadar gebeliğin şekillenebileceği hesaplandı. Yine yaklaşık 21 gün kadar sürdüğü bilinen gebelik ve 18-20 gün kadar (21) devam eden süt emme dönemi boyunca annelerin aynı dozlarda Cd almaları sağlandı. Deneme ve kontrol gruplarındaki her anneden ortalama 7-8 adet yavru elde edildi. Doğumu takiben ilk saatlerde yeni doğan yavrulardan, Deneme Grubu I Föetal Fare (IF) den 37 adet, Deneme Grubu II Föetal Fare (IIF)'den 35 adet ve Kontrol Grubu Föetal Fare (KF)'den 36 adet olmak üzere toplam 108 adet yavru farenin nekropsileri yapıldı. Geriye kalan yavruların süt emme dönemini tamamlamaları sağlandı. Süt emme dönemini tamamlayan yavrulardan, Deneme Grubu I Neonatal Fare (IN)'den 42 adet, Deneme Grubu II Neonatal Fare (IIN)'den 39 adet ve Kontrol Grubu Neonatal Fare (KN)'den 38 adet olmak üzere toplam 119 adet farenin nekropsisi yapıldı.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan yavru fare sayısı, Cd dozu ve Cd'un anneler ve yavrular tarafından alınma süresi.

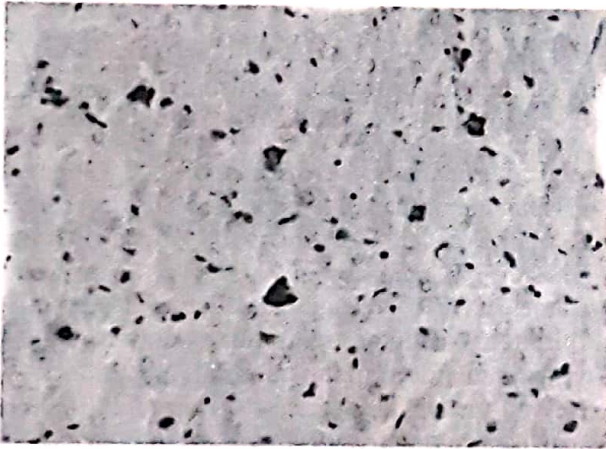
| Gruplar | Yavru fare sayısı | Yavruların Cd alm süresi (gün) | Annelerin Cd alm süresi (gün) | Annelere Verilen Cd miktarı mg/kg/gün | |
|---------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----|
| Grup I | IF | 37 | 21 | 60 | 2.5 |
| | IN | 42 | 39 | 60 | 2.5 |
| Grup II | IIF | 35 | 21 | 60 | 5.0 |
| | IIN | 39 | 38 | 60 | 5.0 |
| Kontrol | KF | 36 | - | - | - |
| | KN | 38 | - | - | - |

F: Fötal yavru fare , N: Neonatal yavru fare

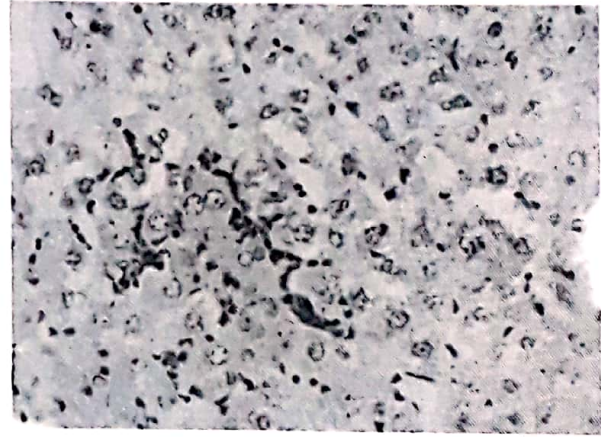
Histopatolojik muayene: Fareler eter ile ötanazi yapılarak nekropsiyeye alındı. Karaciğer, böbrek, beyin, dalak ve kalpten doku örnekleri alınarak %10'luk nötral formalin solusyonunda tespit edildi. Hazırlanan parafin bloklar 5 µm kalınlığında kesilerek Hematoxylin-Eosin (HE) ile boyandı (13) ve ışık mikroskopunda incelendi.

BULGULAR

Her iki deneme grubunda yavru farelerin makroskopik muayenelerinde dikkati çekici belirgin bir patolojik değişim görülmedi.



Şekil 1. Karaciğerde sinuzoidal dilatasyon, hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz, Grup IF, HE X 360.



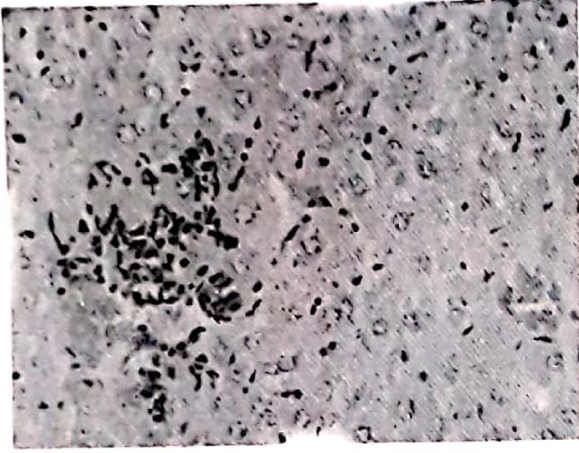
Şekil 2. Karaciğerde hepatositlerde dejenerasyon, Kupffer hücre aktivasyonu, megalositozis (ok), Grup IN, HE X 360.

Mikroskopik Bulgular

Grup I : İntrauterin hayatta Cd aldıkları düşünülen farelerin (IF) karaciğerinde sinuzoidlerde dilatasyon, hepatositlerde dejenerasyon, nekroz (Şekil-1) ve mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Nekroz, hepatositlerin bazılarının sitoplazmalarının cozin ile koyu renkli boyandığı, nukleuslarında nekrotik değişimlerin şekillendiği koagülasyon nekrozu tarzındaydı. Beyinde, korteksde S.grizeadaki nöronlarda dejenerasyon ve nekroz dikkati çekti. Hücreler asidofilik boyanmış olup, nukleusda kromatolizis ile birlikte hücrelerin nekroze gittiği gözlemlendi. Myelinde belirgin bir değişim görülmedi.

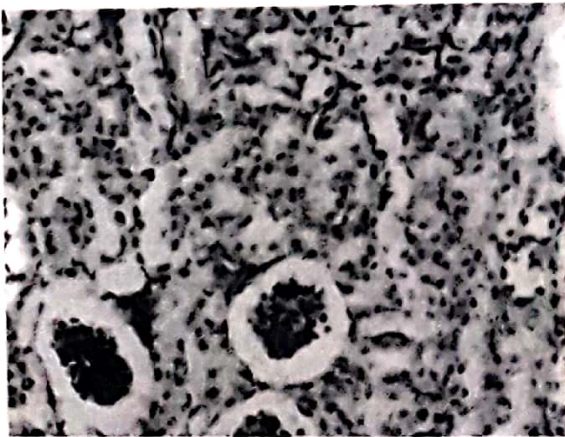
İntrauterin hayatta ve süt emme döneminde Cd aldığı düşünülen yavrularda (IN) ise, beyin ve karaciğerdeki bu bulgulara ilaveten, karaciğerde Kupffer hücre aktivasyonu ve hepatositlerde megalositozis dikkati çekti (Şekil-2). Sinuzoidal bölgede yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Böbreklerde hiperemi, bowman kapsülünde genişleme ve

konvolüt tubulus epitellerinde dejenerasyon göz-
lendi. Beyinde ise, Grup I-F'deki bulgulara benzer
tablo görüldü.



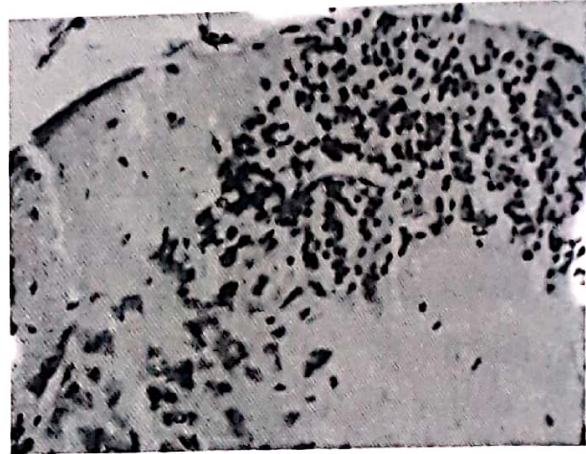
Şekil 3. Karaciğerde sinuzoidal dilatasyon,
hepatositlerde dejenerasyon, fokal
mononükleer hücre infiltrasyonu, Grup IIN,
HE X 360.

Grup II: Neonatal farelerde (IIN) mikros-
kobik olarak, Grup I-IF'de görülen bulgulara ilave-
ten karaciğerde hepatositlerde megalositozis dikka-
tı çaktı. Ayrıca beyinde nöronal dejenerasyon ve
nekrozun daha şiddetli olduğu görüldü.



Şekil 4. Böbrekte hiperemi, bowman kapsülünde geniş-
leme, tubulus eptellerinde dejenerasyon, Grup
IIN, HE X 360

İntrauterin hayatta ve süt emme dönemlerinde
annelerinden Cd alan yavrularda (IIN) ise; karaciğer-
de sinuzoidal dilatasyon, hepatositlerde dejenerasyon,
fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil-3),
nekroz sahaları ve daha belirgin görülen
megalositozis dikkati çaktı. Böbreklerde (Şekil-4) ve
beyinde Grup I-IF'deki bulguların yanısıra, beyinde
korteksde glia hücre infiltrasyonu saptandı (Şekil-5).



Şekil-5: Beyin, korteksde nöron dejenerasyonu ve glia
hücre infiltrasyonu, Grup IIN, HE X 360.

Her iki grupta da incelenen diğer organlarda
belirgin bir bulgu görülmedi. Kontrol grubu yavru
farelerde makroskopik ve mikroskopik olarak herhan-
gi bir bulguya rastlanmadı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer ve böbrek gibi dokularda yüksek o-
randa birikme özelliğine sahip olan kadmiyumun
insan ve hayvanlarda birikimi sakınca yaratabilmek-
tedir. Hayvan türlerinde biyolojik yarı ömrü 200-300
gün kadar iken insanlarda 19-38 yıl arasında değiş-
bilmektedir (20).

Ratlarda gebelik sırasında Cd' un plasentada
önemli dejeneratif değişiklikler yaptığı ve fötal ölüm-
lere sebebiyet verdiği bildirilmiştir (17). Bu çalışmada
kontrol ve deneme grupları arasında elde edilen yavru
sayısı bakımından bir farklılığın olmadığı gözlenmiş-
tir.

Fare ve ratlarda, 2 mg/kg dozundaki Cd'un tek-
rarlanan parenteral uygulamaları ile hepatositlerde
piknoz ve fokal nekroz yanında makrofaj ve

nötrofillerden ibaret çok sayıda yangısal odak saptanmıştır (10). Yine ratlarda 14 gün boyunca, i.v. 3 mg/kg Cd uygulaması sonucu ovariektomi yapılan grupta 3. günde hepatositlerde nekroz şekillendiği (8), bir başka çalışmada (9) ise 13 hafta boyunca Cd uygulaması sonucu 4. haftada periportal hepatitis şekillendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda da neonatal ve süt emme dönemini tamamlayan yavru farelerin karaciğerinde sinuzoidal dilatasyon, dejenerasyon, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Her iki deneme grubunda, süt emme dönemini tamamlayan yavru farelerde belirgin bir megalositozis bulunduğ gözlendi. Cd' un hepatotoksik etkilerinin karaciğerin nonparankimal hücrelerinden salgılanan ve MT sentezini düzenleyen sitokinler vasıtasıyla olduğu ve bu maddelerin hepatositlerde proliferasyon, yangı hücresi infiltrasyonları, fibrinojenesis ve kolestazis gibi pek çok patolojik olaydan sorumlu oldukları savunulmaktadır (10). Karaciğerde şekillenen Cd-MT bileşiği kan yoluyla diğer organlara ve özellikle de böbreklere geçerek lezyon oluşturmaktadır (4,9). Cd toksikasyonuna maruz bırakılan ratların karaciğerlerinin transplante edildiği alıcılarda böbreklerin proksimal tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz (4), ovariektomi yapılan ratlarda da benzer bulgulara ilaveten epitelde vakuolizasyon ve rejenerasyon gözlenmiştir (9). Benzeri bir başka çalışmada (8) böbreklerin proksimal tubulus epitellerinde atrofi, vakuolizasyon ve karyopiknoz, Cd' un oral yolla verildiği ratlarda (15) kortikal tubuluslarda kistik dilatasyon ve epitelde dejenerasyon kaydedilmiştir. Bizim çalışmamızda, böbreklerde özellikle süt emme dönemini tamamlayan yavru farelerde hiperemi, tubulus epitellerinde dejenerasyon ve bowman kapsülünde genişleme

gibi patolojik lezyonlar görülmüş olup, Cd' un MT bileşiği halinde karaciğerden salınımından sonra böbrek hasarı şekillendirdiği (4,9) ve Cd' a bağlı nefrotoksikasyonun bir çok hayvan türünde kronik uygulamaları takiben oluştuğuna dair bilgiler (4,15) dikkate alındığında, oluşan lezyonların desteklendiği görülmektedir. Yine yaptığımız bu çalışmada 5 mg/kg Cd verilen grupta daha belirgin olmak üzere, her iki deneme grubunda şekillenen serebral lezyonlar, Cd' un nörotoksik etkiye sahip bir metal olduğu dikkate alındığında özellikle yeni doğanlarda sinir sistemi lezyonlarının sebebi olabileceğine dair bilgilerle (1,20) uyumludur.

Yapılan çalışmalar, Cd' un parenteral ve per os yolla verilmesi ile oluşan toksikasyonların ve buna bağlı olarak şekillenen lezyonların başlama zamanı, türü ve şiddeti hakkında da çeşitli bulguları ortaya koymaktadır. Ayrıca Cd ile kontamine bölgelerde, kirlilik incelenmesi yapılan hayvansal ürünlerden sütün de Cd ihtiva ettiği saptanmıştır (6,16,18). Ağır metallerin anneden yavruya geçişinin incelendiği bir çalışmada (19), yarasalarda Cd' un maternal dokulardan orta düzeyde ayrıldığı görülmüş, gençlerin çeşitli dokularındaki Cd konsantrasyonunun erişkinlerin meme bezlerindeki düzeye yakın olduğu dikkati çekmiştir. Araştırmacılar, bu durumun annelerden süte geçen Cd miktarı ile alakalı olduğunu kaydetmişlerdir.

Sonuç olarak, kadmiyumun annelerden kan yolu ve süt ile yavrulara geçişi düşünülerek gerçekleştirilen bu çalışmada, intrauterin hayatta ve süt emme döneminde Cd toksikasyonuna maruz bırakılan yavru farelerde oluşan lezyonların incelenmesi ile Cd' un yavru farelerde toksikasyona sebep olduğu patolojik bulgular ile ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Akins JM, Schroeder JA, Brower DL et al. Evaluation of *Drosophila melanogaster* as an Alternative Animal for Studying the Neurotoxicity of Heavy Metals. *Bio Metals*. 1992; 5 (2):111-120.
2. Bires J, Vrzgula L and Juhasova Z. Distribution of Toxic Chemical Elements in the Body of Sheep After Experimental Administration of Industrial Emission. *Veterinari-Medicina*. 1991; 36 (6): 361-371.
3. Carlsson L and Lundholm CE. Characterisation of the Effects of Cadmium on the Release of Calcium and of the Activity of Some Enzymes from Neonatal Mouse Calvaria. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrine*. 1996; 115(3): 251-256.
4. Chan HM, Zhu LF, Zhong R et al. Nephrotoxicity in Rats Following Liver Transplantation from Cadmium- Exposed Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1993;123:89-96.

5. Dzuviç A, Halsband E and Romestand B. Long-Term Effect of Cadmium and Calcium on the Blood Picture of Trout with Reference to Pathological Changes in Internal Organs. Veterinarski Glasnik. 1986; 40: 273-283.
6. Gorska A and Litwineczuk Z. Lead, Cadmium and Inhibitory Substances in Milk From the Podlasie Regiion (Poland). Medycyna Veterynaryjna.1996; 52(9):591-592.
7. Heffron CL, Reid JT, Elfving DC et al. Cadmium and Zinc in Growing Sheep Fed Silage Corn Grown on Municipal Sludge Amended Soil. J. Agri. Food Chemist. 1980; 28: 58- 61.
8. Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J et al. Ovariectomy Enhances Cadmium- Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1993; 119: 267- 274.
9. Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J et al. Cadmium Induced Osteomalacic and Osteopetrotic Lesions in Ovariectomized Rats. Toxicol. Appl. Pharmacol.1994;126: 58- 68.
10. Kayama F, Yoshida T, Elwell MR et al. Role of Tumor Necrosis Factor - α in Cadmium Induced Hepatotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1995; 131: 224- 234.
11. Lansdown ABG and Sampson B. Dermal Toxicity and Percutaneous Absorption of Cadmium in Rats and Mice. Lab.Anim.Sci.1996; 46(5):549-554.
12. Liu J, Liu Y and Klassen CB. The Effect of Chinese Hepatoprotective Medicines on Experimental Liver Injury in Mice. J. Ethnopharmacol. 1994; 42: 183- 191.
13. Mc Manus JFA and Mowry RW. Staining Methods. Histologic and Histochemical. Poul B. Hoeber Inc. 1960.
14. Osuna O and Edds GT. Toxicology of Aflatoxin B₁, Warfarin, and Cadmium in Young Pigs: Clinical Chemistry and Blood Coagulation. Am.J.Vet.Res. 1982; 43(8): 1387-1394.
15. Saygı Ş, Deniz G, Kutsal O et al. Chronic Effects of Cadmium on Kidney, Liver, Testis, and Fertility of Male Rats. Biol. Trace El. Res. 1991; 31: 209- 214.
16. Schwarz T, Bush A and Lenk R. Preliminary Studies on Lead, Cadmium and Arsenic Contents of Feed, Cattle and Food of Animal Origin Coming From Different Farms in Saxony. Deutsche Tierarzt. Woschenschrift. 1991; 98(10): 369-372.
17. Shiraishi N, Barter RA, Uno H et al. Effect of Progesteron Pretreatment on Cadmium Toxicity in the Male Fischer (F 344/NCr) Rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1993 ; 118: 113- 118.
18. Simonik I, Pavelka J and Kuldac E. Contamination of Bovine Colostrum by Chemical Elements. Veterinarstvi. 1990; 40(3): 135-136.
19. Streit B and Nagel A. Heavy Metal Transfer by Lactation in a Bat Colony.Fresenius Environ. Bull. 1993; 2(3): 168-173.
20. Şanlı Y. Metaller ve Diğer İnorganik Maddeler. Kaya S, Şanlı Y, Piriñçi İ, Yavuz H, Baydan E , Demet Ö, Bilgili A, Editörler. Veteriner Klinik Toksikoloji. 2. Baskı. Ankara. Medisan Yayınevi. 1995; 87-90.
21. Yavru N ve Yavru S. Deney Hayvanları. S.Ü. Vet.Fak. Yayın Ünitesi, Konya, 1996.
22. Yoshiki S , Yanagisawa T, Kimura M et al. Bone and Kidney Lesions in Experimental Cadmium Intoxication. Arc. Environ. Health. 1975; 30: 559-562.