

## Deneyisel Kadmiyum Toksisitesinde Melatonin Hormonunun Karaciğer Üzerindeki Koruyucu Etkisi: İmmunohistokimyasal Bir Çalışma

Burak Gülçen<sup>1</sup>, Ömür Karaca<sup>1</sup>, Murat Abdülğani Kuş<sup>2</sup>, Nusret Akpolat<sup>3</sup>, İlter Kuş<sup>1</sup>

### ÖZET

Kadmiyum (Cd) endüstride yaygın olarak kullanılan ve insan sağlığını olumsuz etkileyen ağır metallere biridir. Bu çalışmada, sıçanlarda, kadmiyumun indüklediği akut karaciğer toksisitesine karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Ortalama 170-220 gr. ağırlığında 21 adet Wistar-Albino cinsi yetişkin erkek sıçan, rastgele üç eşit gruba ayrıldı: Kontrol, kadmiyum klorür (CdCl<sub>2</sub>), kadmiyum ve Melatonin (Cd+Melatonin). Kadmiyum grubu sıçanlara, Kadmiyum (1 mg/kg) 30 gün boyunca subkutan yoldan enjekte edilirken, Cd+Melatonin grubunda yer alan hayvanlara ise Cd (1 mg/kg) subkutan yoldan ve Melatonin (25mg/kg) 30 gün boyunca, her gün, intraperitonel yoldan enjekte edildi. Kontrol grubu sıçanlara ise salin enjekte edildi. Karaciğer dokuları, immunohistokimyasal yöntem ile Isı Şok proteini 70 (İŞP70) immunoreaksiyonu için boyandı. Kadmiyum grubu sıçanlarda, kadmiyum toksisitesine bağlı olarak karaciğerde, İŞP70 immunoreaksiyonunu gösteren yoğun bir boyanma görüldü. Kadmiyum ile birlikte melatonin enjekte edilen sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerinde ise minimal İŞP70 boyanması tespit edildi. Melatonin hormonunun, kadmiyumun toksik etkisinin göstergesi olan İŞP70 immunoreaksiyonunu önemli ölçüde azalttığı ve karaciğer hasarına karşı koruyucu rol oynadığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kadmiyum, melatonin, karaciğer, İŞP70.

## The Protective Effects Of Melatonin Hormone Against Experimental Cadmium Toxicity In The Liver: An Immunohistochemical Study

### ABSTRACT

Cadmium (Cd) is one of the heavy metals which widely used in industry and adversely affecting human health. The potential for protective effects of melatonin on cadmium-induced acute liver injury in rats was investigated in this work. Twenty-one male Wistar-Albino rats were randomly divided into three equal groups: control, cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), cadmium and melatonin (Cd+Melatonin). Rats in Cd group were injected subcutaneously with Cd (1 ml/kg) for 30 days, while rats in Cd+Melatonin group were injected subcutaneously with Cd (1 mg/kg) and injected intraperitoneally plus melatonin (25 mg/kg) for 30 days. Control rats were injected salin. Hepar tissues were stained with heat shock protein 70 (Hsp70) immunohistochemically performed. A dense staining indicating Hsp70 immunoreaction was observed in the liver depending on the toxicity of cadmium in the rats of cadmium group. The liver tissue sections of rats injected with melatonin and Cd, the HSP70 staining was detected minimal. It was detected that Melatonin hormone significantly reduced Hsp70 immunoreaction which is an indicator of cadmium toxicity and plays a protective role against the liver damage.

**Key Words:** Cadmium, melatonin, liver, Hsp70.

<sup>1</sup> Anatomi Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup> Sağlık Yüksekokulu, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur, Türkiye

<sup>3</sup> Patoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye

**Correspondence:** Dr. Ömür Karaca, e-mail: omurkaraca@balikesir.edu.tr

## GİRİŞ

Kadmiyum (Cd), havada, toprakta ve yiyeceklerde bulunan ağır bir metaldir. Cd, sigara, batarya, boya maddeleri vb. gibi endüstriyel ürünlerin içinde bulunmaktadır. Sigara önemli bir kadmiyum kaynağıdır ve bir adet sigara 1-2 µg kadmiyum içerir (1). Cd, ince bağırsaklardan absorbe olur ve idrarla atılır (2). Karaciğer ve böbrek, sistemik kadmiyumun elimine edilmesinde rol oynayan birincil organlardır (3). Vücuda giren kadmiyum, kan dolaşımındaki proteinlere ve kan hücrelerine bağlanarak taşınır (4). Vücutta karaciğer fibrozisi, böbrekte tübül disfonksiyon, hipertansiyon, osteoporoz ve kanser gibi bazı patolojik durumlara sebep olabilir (5). Kadmiyumun oluşturduğu sitotoksik etkilerden, serbest radikaller oluşturması ve antioksidan savunma sisteminde bozukluğa neden olması sorumlu tutulmaktadır (6,7). Serbest radikaller hücrede proteinleri, DNA'yı ve membran lipitlerini etkileyerek hücre fonksiyonlarının ve bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Kadmiyumun toksik etkilerine karşı melatonin (8), taurin (9), naringenin (10), çinko ve bazı vitaminlerin (selenyum) (11) etkileri araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), pineal bez tarafından sirkadiyan ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur. Vücutta endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır (12). Melatonin hem lipofilik hem de hidrofilik olmasından dolayı vücudun her hücresine girebilme özelliği bulunduğu için, deoksiribo nükleik asidi (DNA), membran lipitlerini ve sitozölü korumaktadır (13). Melatoninin farklı organ ve dokularda direkt serbest radikal süpürücü ve indirekt antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (8, 14). Melatonin antioksidan özelliğini, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) gibi enzimleri aktive ederek gösterir (15).

Isı şoku proteinleri (İŞP), sitoplazmada, mitokondride ve endoplazmik retikulumda proteinlerin birleşmesine, paketlenmesine, taşınmasına, yıkımına ve toplanmasına yardım eden moleküler kovalentlerdir (16,17). İlk olarak hücrelerde ısı şokuyla tespit edildikleri için İŞP adıyla anılırlar (18). Bu protein ailesinden olan 70 kDa'lık İŞP70 (HSP70), stressiz hücrelerde çok düşük miktarlardayken, stresi takiben hızlı bir yükselme gösterdiği için en sık çalışılan İŞP'dir. Bu proteinler herhangi bir stres sebebiyle hücre zarar gördüğünde, hücre içi proteinlerini onararak yapılarını korur ve fonksiyonlarının devamını sağlarlar (19). Dokularda İŞP70'in immunoreaktivitesinin artması, herhangi bir nedenle oluşan toksik etkinin İŞP sentezini indüklediğini ifade etmektedir. Böylece İŞP70'in dokudaki ve hücredeki immunolokalizasyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi o hücrede oksidatif hasarın olduğunu bir göstergesidir.

Bu çalışmada, sıçanlarda, kadmiyum'un hepatotoksik etkisine karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin, immunohistokimyasal yöntemle,

karaciğerde İŞP70 protein sentezi analiziyle ortaya konulması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, ağırlıkları 170-220 gram arasında değişen toplam 21 adet yetişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Rastgele üç eşit gruba ayrılan sıçanlar, özel hazırlanmış kafeslerde, ısı ayarlanmış (22±1 °C), 12 saat güneş ışığı alan ve özel havalandırma tertibatı olan ortamda, yeterli miktarda su ve sıçan yemi ile beslendi. Kontrol grubu sıçanlara, 30 gün boyunca ve her gün subkutan (sc) yoldan salin enjekte edildi. Kadmiyum grubu sıçanlara 30 gün boyunca, her gün kadmiyum klorür (CdCl<sub>2</sub>) (1 mg/kg, sc) uygulandı. Cd+melatonin grubunda yer alan hayvanlara ise aynı süre ve dozda kadmiyum yanı sıra 25 mg/kg Melatonin (0.1 ml. alkol içinde çözüldü) intraperitonel (ip) yoldan enjekte edildi. İlaç etkileşimini ve ilaç emilimini etkilememek için kadmiyum enjeksiyonları sabah, melatonin enjeksiyonları ise aynı gün öğleden sonra yapıldı.

### İmmunohistokimyasal Analiz

30 günlük deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Alınan karaciğer dokuları Bouin solüsyonunda tespit edildi. Doku örnekleri rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek, parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm. kalınlıkta kesitler alındı. Kesitler poly-L-lysine ile kaplanan lamalar üzerine alındı. Daha sonra lamalar immünohistokimyasal olarak boyandı. Boyamada ABC Metodu kullanıldı. Bu yöntemde preparatlar deparafinizasyondan sonra, sırasıyla distile suda 5 dakika, pH'ı 7.6 olan fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de 5 dakika yıkandı. "Antijen retrieval" işlemi 750 W dalga boyuna ayarlanmış mikrodalga fırında Citrate Buffer (pH=6.0) içinde 5 dakika uygulandı. Daha sonra, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (Sigma) 5 dakika, tekrar PBS'de 5 dakika (pH = 7.6) yıkandı. Daha sonra İŞP70 primer antikoruyla (Biogenex San Ramon, CA) oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. PBS'de 5 dakika (pH = 7.6) bekletildi ve ardından 30 dakika sekonder antikor (Biogenex San Ramon, CA) uygulandı. Streptavidin peroksidaz, AEC kromojen (Sigma) uygulamasından sonra, Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve dehidratasyon işleminden sonra özel kapatma maddesi (CC/MOUNT, DBS, Pleasanton, CA, USA) ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyamada primer antikor olarak Biogenex firmasının kullanıma hazır, rabbit, monoklonal İŞP70 kullanıldı. Kesitler ışık mikroskopik olarak Olympus BX50 mikroskopuyla patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi boyanma yoğunluğuna göre yapıldı. Böylece dokularda veya hücrelerde İŞP70'in fazla immunoreaksiyonu, koyu boyanma ile kendini göstermektedir. İmmunohistokimyasal olarak İŞP70 boyanma reaksiyon şiddeti, 0'dan +5'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Tablo 1).

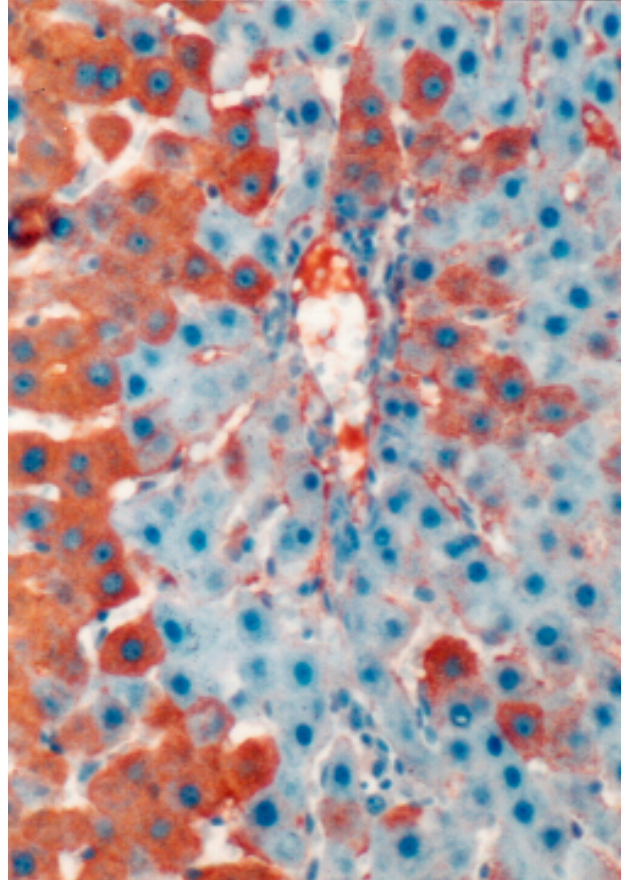
## BULGULAR

Çalışmamızda, kadmiyum toksisitesine bağlı olarak karaciğerde ortaya çıkan oksidatif doku hasarının ve bu hasar üzerine melatonin hormonunun koruyucu etkisini ortaya koymak amacıyla, immunohistokimyasal olarak

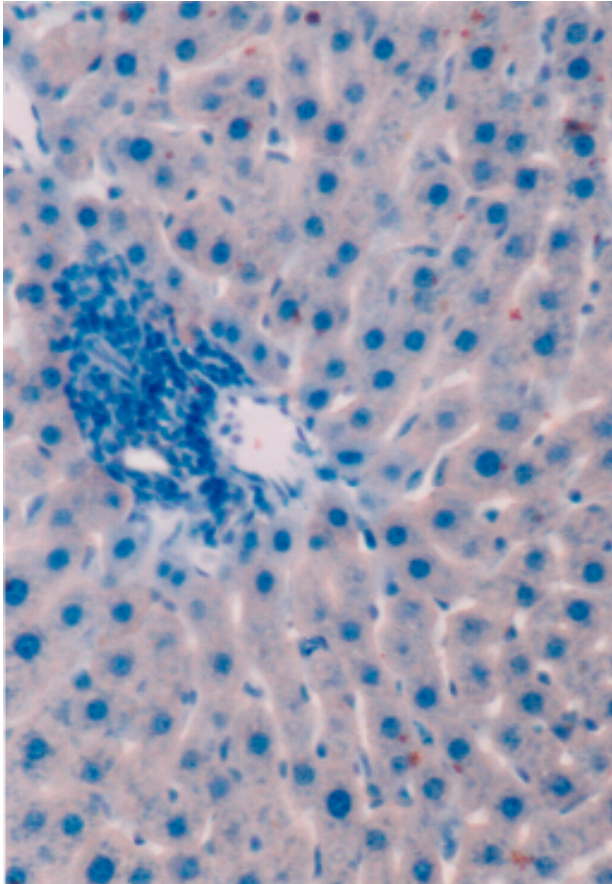
IŞP70 ile boyanmış kesitler gözden geçirildi. Saptanan immunoreaksiyon yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı. Kontrol grubuna ait karaciğer dokularında IŞP70 boyanmasına rastlanmadı (0) (Şekil 1). Kadmiyum grubu sıçanların karaciğer dokularında IŞP70 immunoreaksiyonunu gösteren yoğun bir boyanma görüldü (+5) (Şekil 2-3). Cd+melatonin grubunda ise minimal IŞP70 boyanması görüldü (+1) (Şekil 4).

**Tablo 1:** İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecelendirilmesi.

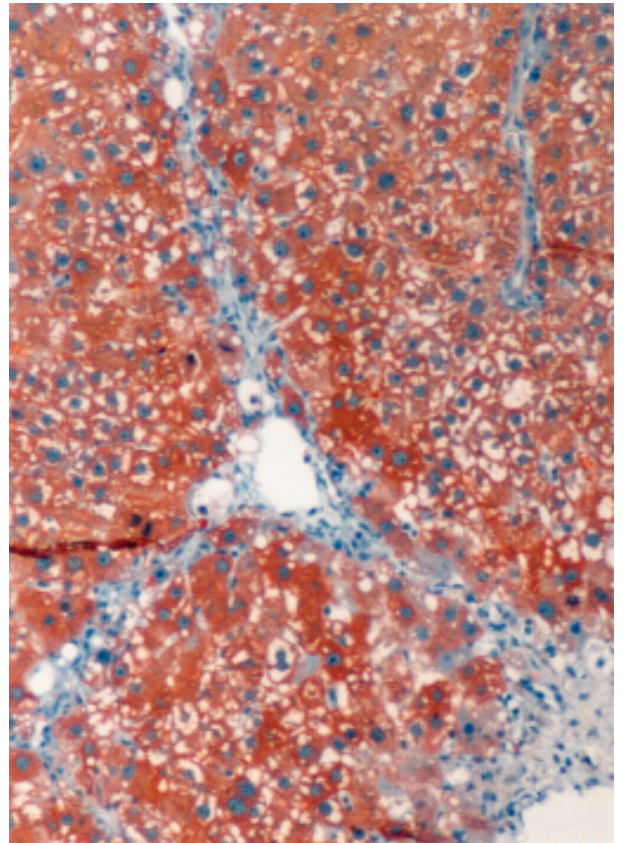
Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Minimal
+2	Az
+3	Orta
+4	Çok
+5	Şiddetli



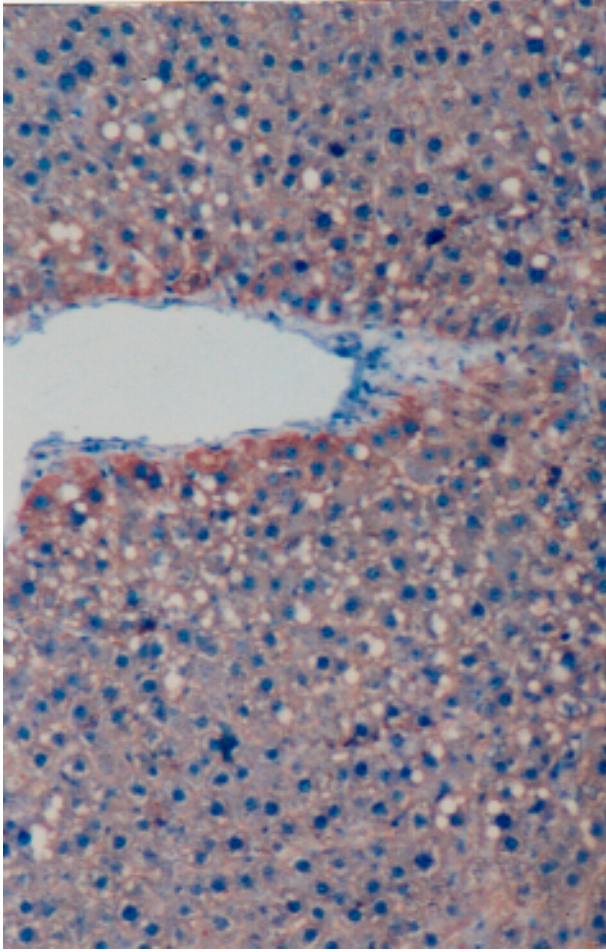
**Şekil 2:** Kadmiyum toksisitesi sonucu karaciğer dokusunda şiddetli IŞP70 boyanması X40



**Şekil 1:** Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokusunun görünümü X40



**Şekil 3:** Kadmiyum toksisitesi sonucu karaciğer dokusunda yoğun IŞP70 boyanması X40



**Şekil 4:** Kadmiyum ile birlikte melatonin uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda minimal düzeyde IŞP70 boyanması X40

### TARTIŞMA

Kadmiyuma bağlı karaciğer toksisitesinin oluşmasında oksidatif stres önemli rol oynar. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikalleri, hücre membran lipid ve proteinlerini yıkarak, hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Hücre içi ve hücre dışı membranlarda lipid peroksidasyonunun artması organ, doku ve hücrelere zarar vermektedir (8, 9, 14). Lipit peroksidasyonu, uzun süreden beri kadmiyum toksisitesi için primer mekanizma olarak düşünülmektedir (20). Yapılan çalışmalarda, kadmiyumun karaciğerde yağ dejenerasyonu, sinüzoidlerde dilatasyon, nekroz, fibrozis, mononükleer hücre infiltrasyonu, granüler endoplazmik retikulumda dilatasyon, fragmantasyon ve vezikülasyon gibi patolojik sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir (8, 10). Kadmiyumun, karaciğer, akciğer gibi dokularda, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerinde artışa, antioksidan enzimlerden olan

süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) değerlerinde ise azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir (8). Kadmiyum toksisitesini tespit etmeye yönelik yapılan başka bir çalışmada ise kadmiyumun dokularda IŞP70 proteinlerinde aşırı bir uyarılmaya neden olduğu belirtilmiştir (21). Çalışmamızın immunohistokimyasal analiz sonuçlarında da; kadmiyum toksisitesi sonucu karaciğerde şiddetli IŞP70 boyanmasının olduğu tespit edildi. Bu nedenle kadmiyuma bağlı olarak karaciğerde oluşan toksik etki yönüyle çalışmamız daha önce yapılmış olan araştırmalarla uyum göstermektedir.

Kadmiyumun oluşturduğu hasarı önlemeye veya ortadan kaldırmaya yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde, kullanılan antitoksik ajanların, antioksidan veya serbest radikal giderici özelliklerinden yararlandığı görülür. Antioksidan savunma sisteminin bozukluğu, kadmiyum bağlı hepatotoksistide kritik bir olay olarak kabul edilir (10). Melatoninin direk serbest radikal süpürücü etkisi, kadmiyumun oluşturduğu toksik etkiyi önlemede önemli bir özelliktir (8). Vücutta birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan melatonin hormonunun güçlü bir antioksidan olduğu ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (8, 14). Yapılan çalışmalarda karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisi olduğu, melatonin hormonunun, serum AST, ALT, ALP, total bilirubin ve direkt bilirubin seviyelerini azalttığı belirtilmiştir (22, 23). Başka bir çalışmada, melatoninin, kadmiyumun oluşturduğu karaciğer hasarını ve yağ peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz'ı (GSH-Px) artırarak oluşan toksik etkiye karşı karaciğeri koruduğu belirtilmiştir (8, 9, 14). Bu çalışmada da kadmiyumun indüklediği karaciğer hasarına karşı melatoninin hepatoprotektif etkisi immunohistokimyasal analiz ile ortaya konuldu. Melatonin enjekte edilen sıçanların karaciğerlerinde, hücre hasarının bir göstergesi olan IŞP70 boyanmasının minimal düzeyde olduğu tespit edildi.

İmmunohistokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda, kadmiyum maruziyeti sonucu karaciğerde meydana gelen toksik etkiye karşı melatonin hormonunun koruyucu bir rolü olduğu tespit edildi.

### KAYNAKLAR

1. Public Health Statement for Cadmium, July 1999. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html>.
2. Stohs SJ, Bagchi D, Bagchi M. Toxicity of trace elements in tobacco smoke. *Inhal Toxicol* 1997; 9: 867-890.
3. Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Lin TH. Cd-induced liver, heart, and spleen lipid peroxidation in rats and protection by selenium. *Biol Trace Elem Res* 2000; 78: 219-230.
4. Thevenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule insights from cadmium. *Nephron Physiol* 2003; 93: 87-93.

5. World Health Organization Environmental Health Criteria, 134 Cadmium. IPCS, Geneva 1992.
6. Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicol* 2002; 179: 37-50.
7. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 940-51.
8. El-Sokkary GH, Nafady AA, Shabash EH. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotox Environ Safe* 2010; 73: 456-463.
9. Aydođdu N, Erbař H, Kaymak K. Taurin, melatonin ve n-asetilsisteinin kadmiyuma bağlı akciğer hasarındaki antioksidan etkileri. *Trakya Univ Tip Fak Derg* 2007; 24 :43-48.
10. Renugadevi J, Prabu SM. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62: 171-181.
11. Ognjanovic, BI, Markovic, SD, Pavlovic SZ, Zikic RV, Stajin AS, Saicic ZS. Effect of chronic cadmium exposed on antioxidant defense system in some tissue of rats: protective effect of selenium. *Physiol Res* 2008; 57: 403-411.
12. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
13. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrin* 2004; 25: 177-195.
14. Kim Cy, Lee MJ, Lee Sm, Lee WC, Kim JS. Effect of melatonin on cadmium-induced hepatotoxicity in male sprague-dawley rats. *Tohoku J Exp Med* 1998; 186: 205-213.
15. Özmete Ö. Kronik Özofajial Striktür Geliřen Çocuklarda Oral Midazolam, Deksmetomidin Ve Melatonin Premedikasyonunun Karşılaştırılması. Uzmanlık tezi. Çukurova üniversitesi, 2009, Adana.
16. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann Rev Cell Biol*, 1993; 9: 601-634.
17. Boone AN, Vijayan MM. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comp Biochem Phys C* 2002; 132: 223-233.
18. Subjeck JR, Sciandra JJ, Johnson RJ. Heat shock proteins and thermotolerance a comparison of induction kinetics. *Br J Radiol* 1982; 55: 579-584.
19. Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem*, 1985; 18: 239-280.
20. Eneman JD, Potts RJ, Osier M, Shukla GS, Lee CH, Chin JF. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicol* 2000; 147: 215-228.
21. Hung JJ, Cheng TJ, Chang MT, Chen KD, Huang HL, Lai YK. Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem* 1998; 71; 21-35.
22. Kus I, Murat Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-174.
23. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1452-1458.