

Kadmiyum maruziyeti spinal refleks yanıtlarının amplitüdünü arttırır

Gülten Erken*, Osman Genç**, Haydar Ali Erken***,
Sebahat Turgut**, Günfer Turgut**.

*Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD., Balıkesir.

**Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD., Kınıklı, Denizli.

***Balıkesir Devlet Hastanesi, Balıkesir.

Özet

Amaç: Kadmiyum çevresel bir kirletici ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının potent bir inhibitörüdür. Kadmiyumun santral ve periferik sinir sisteminde fonksiyonel bozukluklara neden olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada kadmiyumun spinal reflekslere etkisi araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** 14 adet, erkek sıçan Kontrol ve Kadmiyum grubu olarak ikiye ayrılmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlara içme suyu, Kadmiyum grubundaki hayvanlara ise kadmiyum klorür (70 mg/L) içme suyunda çözülerek 60 gün boyunca verilmiştir. Deneysel periyodun sonunda siyatik sinir elektriksel olarak uyarılarak L5 ventral kökünden refleks potansiyelleri kaydedilmiştir. **Bulgular:** İstatistiksel analiz sonrasında kadmiyum grubunun refleks yanıtlarının amplitüdüleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulunmuştur. **Sonuç:** Kadmiyuma subkronik maruziyet spinal refleks yanıtlarını etkiler ve insanlarda da olası benzer sonuçları düşündürür.

Anahtar kelimeler: kadmiyum, spinal refleks, sıçan.

Abstract

Cadmium exposure increases the amplitudes of spinal reflex responses

Objective: Cadmium is an environmental pollutant and which is a potent inhibitor of voltage-dependent calcium channels. It has been shown that cadmium can causes functional disturbances in central and peripheral nervous system. In this study, it has been aimed to investigate the effects of cadmium on the spinal reflexes. **Materials and Methods:** Fourteen, male rats were divided into two groups: Control and Cadmium. Control group animals received tap water and the rats of Cadmium group received cadmium as in the form of cadmium chloride (70 mg/L) diluted in their drinking water during the experimental period. At the end of the 60 days experimental period, the sciatic nerve was stimulated electrically with single pulses and the reflex potentials were recorded from the ipsilateral L5 ventral root. **Results:** After the statistical analysis, the reflex response amplitudes were significantly increased in Cadmium group in comparison to the Control group. **Conclusion:** Subchronic exposure to cadmium affects the rat's spinal reflex responses and extrapolation of these results to humans indicate similar possible consequences.

Key words: cadmium, spinal reflex, rat

Giriş

Kadmiyum, farklı yollarla çevresel kontaminasyonu olan bir geçiş metalidir. İnsanların kadmiyuma maruziyetinin en önemli yolları besinler ve sigara dumanıdır. Bunun dışında batarya fabrikaları gibi kadmiyum içeren endüstriyel ürünleri üreten fabrikaların işçileri, mesleki olarak kadmiyuma maruz kalmaktadır. Kadmiyum toksisitesi pek çok

araştırmacı tarafından akciğer fibrozisi, renal tübüler disfonksiyon, hipertansiyon, osteoporoz gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (1). Kadmiyum toksisitesinin santral ve periferik sinir sisteminde çeşitli bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (2,3). Kadmiyumun kalsiyum kanal blokajı gibi (4), hücre membranında yer alan ve iyon akımını kontrol eden proteinlerle etkileşimi yanında, nörotransmitter iletimine olan etkisi bu bozukluklara aracılık edebilir (5).

Yazışma Adresi: Gülten Erken
Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD.,
Balıkesir/Türkiye.
Tel : 0 266 612 13 84 / 0 505 266 59 09
E-mail: gulemmun@gmail.com

Müracaat tarihi: 28.03.2011

Kabul tarihi: 24.07.2011

Monosinaptik spinal refleksler, fonksiyonel sinir sisteminin en temel devrelerindedir. Monosinaptik spinal reflekslerin test edilmesi sinir sisteminde hem periferik sinir fonksiyonları, hem de sinaptik iletinin özellikleri hakkında temel bir bilgi verir. Bu çalışmada, subkronik kadmiyum maruziyetinin monosinaptik spinal refleksler üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Hayvanlar: Çalışma için, ortalama ağırlıkları 257 ± 46 g olan, 14 adet erişkin (4-6 aylık), Sprague Dawley erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi' nden sağlandı. Sıçanlar, veteriner hekim gözetiminde, her kafeste 3-4 hayvan olacak şekilde, 22-25C sıcaklıkta, % 60 nem oranında, gürültüsüz ve iyi havalandırılmış olan bir ortamda, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü uygulanarak, besin ve su alımı kısıtlanmaksızın barındırıldı. Hayvanların bakımı ve deneysel prosedür, "U.S. Department of Health and Human Services" tarafından basılan "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" ta belirtilen şekilde uygulandı.

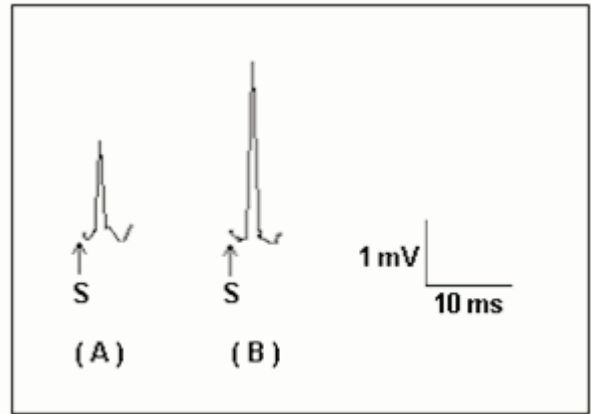
Deneysel Gruplar ve Cerrahi Prosedür: Sıçanlar Kontrol ve Kadmiyum grubu olarak eşit sayıda iki gruba ayrıldı. Kadmiyum grubundaki hayvanlar, içme sularında 70 mg/L kadmiyum klorür (Sigma Aldrich, Germany) çözülerek, kadmiyuma maruz bırakıldı. Bu süreç boyunca Kontrol grubundaki hayvanlara normal içme suyu verildi. 60 günlük deneysel periyodun sonunda üretan (1 g/kg, i.p.) (Sigma Aldrich, Germany) anestezisi altındaki sıçanların lumbosakral bölgelerinde laminektomi yapıldı. L5 segmentinin ventral kökü, diğer doku bölümlerinden, yüzeyi likit parafinle kaplanarak, izole edildi. Ardından sol uyluk bölgesinin diseksiyonu sonrası siyatik sinir izole edilerek stimülasyon için bipolar gümüş-gümüş klorid elektrod sinire yerleştirildi. Toprak elektrodu ise hayvanların kulaklarına yerleştirildi. Stimulus, siniri oluşturan tüm liflerin uyarılması için yeterli olan eşik değerinin üzerinde bir değere ayarlandı (10 V, 0.2 Hz, 0.2 ms). Siyatik sinirin bipolar elektrodla uyarımını takiben, ipsilateral L5 ventral kökten monosinaptik refleks potansiyelleri alındı. Stimulus verilmesi ve refleks cevapların kaydı için PowerLab/8SP (ADInstruments, Castle Hill, Australia) veri kazanım sistemi ve Scope 3.7.5 paket programı kullanıldı. Arka arkaya alınan 15 refleks yanıtının kayıtlanmasından sonra monosinaptik refleks potansiyellerinin amplitüdüleri ölçülerek ortalamaları alındı. Ede edilen veriler, analiz için SPSS paket

programına aktarıldı. Kayıt alınması sırasında hayvanların rektal sıcaklıklarının 36 ± 0.5 C olarak sürdürülmesi, bir ısıtma pedi aracılığıyla sağlandı. Sonuçlar Kontrol grubunun ortalama yanıtları %100 kabul edilerek, Kadmiyum grubunun verileri Kontrol grubunun ortalama değerinin yüzdesi olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz: Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (Ort \pm SS) olarak gösterildi. İstatistiksel analiz için SPSS 10.0 istatistiksel paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanıldı. Verilerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

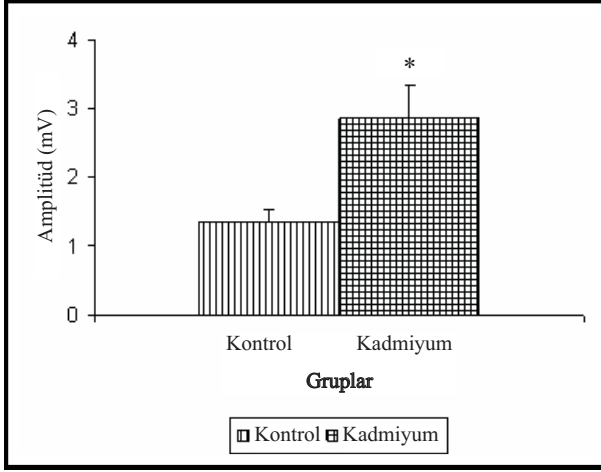
Monosinaptik refleks cevaplarının kayıt örnekleri Şekil 1' de gösterilmiştir. Buna göre Kadmiyum grubu Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Kadmiyum grubunun monosinaptik refleks cevaplarının amplitüd değerleri (2.87 ± 0.48 mV) Kontrol grubunun değerlerine göre (1.34 ± 0.19 mV) istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış bulundu (Şekil 2). Fakat Kadmiyum grubunun monosinaptik refleks cevaplarının latansında (3.62 ± 0.35 msn) Kontrol grubunun değerlerine göre (3.38 ± 0.49 msn) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.



Şekil 1. Monosinaptik refleks cevaplarının kayıt örnekleri. A: Kontrol grubundan bir kayıt örneği; B: Kadmiyum grubundan bir kayıt örneği.

Tartışma

Kadmiyumun santral sinir sisteminin fonksiyonlarına farklı düzeylerde etkisini deneysel olarak göstermek için daha önce çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bir kısmı, kadmiyumun nöronal fonksiyonlara hücre düzeyinde etkisini göstermek için yapılan, iyon kanalları veya nörotransmitter salınımı ile ilgili çalışmalar iken; diğer bir kısmı, kortikal nöronların



Şekil 2. Kadmiyumun monosinaptik refleks cevaplarının amplitüdlerine etkisi. Sonuçlar Ort±SS şeklinde gösterilmiştir.*: $p < 0.05$, Kontrol grubundan fark.

ortaklaşa fonksiyonları sonucunda ortaya çıkan EEG dalgalarını kayıtlamak gibi, sinir sisteminin nispeten karmaşık işlevleriyle ilgili çalışmalardır. Bu çalışmada kadmiyum maruziyetinin sıçanlarda monosinaptik spinal reflekslere etkisi test edilmiştir. Kadmiyum verilen sıçanlarda monosinaptik spinal refleks amplitüdlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığı, monosinaptik spinal refleks yanıtlarının latansının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde değişmediği bulunmuştur. Daha önce kadmiyumun nörofizyolojik fonksiyonlar üzerindeki etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur. Papp ve ark. erişkin sıçanlara 4, 8, 12 hafta süreyle 3.5, 7.0 ve 14.0 mg/kg dozda kadmiyum uygulamışlardır. Sadece 7 ve 14 mg/kg dozda kadmiyum uygulanan sıçanların sinir iletim hızlarında, 12 hafta sonra kontrole göre azalma olduğunu saptamışlardır. Buna karşın daha düşük dozda ve daha kısa süreli kadmiyum uygulanan gruplarda sinir iletim hızlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlememişlerdir (6). Institóris ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise, 6-7 haftalık sıçanlara 4, 8 ve 12 hafta boyunca gavaj yoluyla verilen 6.43 mg/kg dozda kadmiyumun sadece 12. haftada sinir ileti hızını kontrole göre anlamlı şekilde arttırdığı; vizüel, akustik ve somatosensoriyel stimulus sonrası kaydedilen duysal uyarılmış potansiyellerin latansını, kontrole göre anlamlı şekilde kısalttığı gösterilmiştir (3). Yukarıda belirtilen çalışmaların ikisinde de kadmiyuma farklı dozlarda maruziyet, 12. haftadan önce elektrofizyolojik yanıtlarda kontrole göre anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Bizim çalışmamızda da maruziyet süresi yaklaşık 8 hafta (60 gün) olup bu sürenin sonunda yapılan elektrofizyolojik kayıtlama sonrası,

spinal refleks yanıtlarının latansında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Diğer taraftan Yargıçoğlu ve ark., 15 mg/L konsantrasyonda sıçanların içme suyunda çözülen kadmiyuma prenatal 22 gün boyunca maruz kalan annelerin yavrularında, bundan başka prenatal 22 gün+postnatal 8 gün maruz kalan yavrularda ve prenatal 22 gün+postnatal 38 gün maruz kalan yavrularda, kadmiyumun, sinir ileti hızını kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde azalttığını bulmuşlardır. Fakat aynı çalışmada, bileşik aksiyon potansiyeli amplitüdlерinin sadece son gruptaki yavrularda kontrole göre anlamlı şekilde azaldığını göstermişlerdir (7). Bu çalışmanın bulguları, bizim çalışmamızdaki bulgularla çelişiyor gibi görünmektedir. Bunun sebebi bizim çalışmamızda erişkin hayvanların kullanılması olabilir. Çünkü hayvanların artan yaşıyla birlikte metalotiyonein proteininin plazma konsantrasyonu da artar ve plazmadaki kadmiyumu bağlayarak, toksisite bulgularının ortaya çıkmasını azaltabilir (8). Kadmiyumun toksik etkilerine membrandaki iyon kanalları, taşıyıcı pompa proteinleri, oksidatif stres oluşumu ve nörotransmitter metabolizması üzerindeki etkilerinin aracılık edebildiği gösterilmiştir (9,5,10). Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamız L tipi kalsiyum kanal blokajı yaptığı bilinen (11) kadmiyumun monosinaptik spinal reflekslere etkisini araştıran ilk çalışmadır. Fakat, literatürde L tipi kalsiyum kanal blokajı yapan başka bir ajan olan Verapamil' in spinal reflekslere etkisi gösterilmiştir. Taşçı ve ark., kedilerde yaptıkları bu çalışmada Verapamil' in 5, 10 ve 20 mg/kg tek doz periton içi enjeksiyonundan sonra spinal refleks amplitüdlерinin anlamlı şekilde azaldığını göstermişlerdir (12). Bizim çalışmamızdaysa 60 günlük kadmiyum maruziyeti, spinal refleks amplitüdlерini kontrole göre anlamlı biçimde arttırmıştır. Bunun iki sebebi olabilir. Bunlardan birincisi, kadmiyumun spinal refleksleri düzenlemek için L tipi kalsiyum kanal blokajından başka mekanizmalar kullanmasıdır. Örneğin Molnar ve ark. bir su salyangozu olan *Lymnaea stagnalis*' ten izole edilen nöronlarda 50µM dozda ekstraselüler kadmiyumun GABA' nın aktive ettiği klor akımlarını bloke ettiğini göstermişlerdir (13). Aynı araştırmacılar, kadmiyumun G proteinine bağlı bir hücre yüzey metal reseptörüne bağlanıp sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını tetiklediğini, böylece hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak klor akımlarını bloke ettiğini sürmüşlerdir (13). Arito ve ark. 15 hafta boyunca tekrarlayan cilt altı kadmiyum enjeksiyonları yaptıkları sıçanlarda, beyin epinefrin düzeyinin

kontrole göre anlamlı biçimde arttığını bulmuşlardır (14). İnhibitör bir nörotransmitter olan GABA' nın etkisinin kadmiyum tarafından bloke edilmesi, yine santral sinir sisteminde eksitatör bir etkinliği olan epinefrin konsantrasyonunda kadmiyumun oluşturduğu artış, çalışmamızda kadmiyum maruziyetiyle spinal refleks amplitüdünde kontrole göre gözlenen artışı açıklayabilir. Taşçı ve ark.' nın uyguladığı akut L tipi kalsiyum kanal blokajında spinal refleks amplitüdünde düşme gözlenirken (12); çalışmamızda L tipi kalsiyum kanallarını bloke ettiği bilinen kadmiyumun subkronik maruziyeti sonrası spinal refleks amplitüdünde artış gözlenmesinin ikinci olası nedeni; kadmiyum toksisitesinin sinir sistemi fonksiyonları üzerindeki inhibitör veya eksitatör etkinliğinin, kadmiyumun uygulama dozu ve süresiyle ilişkili olarak ortaya çıkmasıdır.

Besinler, sigara, endüstriyel iş yerleri gibi kaynaklardan subkronik olarak maruz kalınan kadmiyum, sinir sisteminin en temel işlevi olan spinal reflekslerde bozukluğa neden olmaktadır. Kadmiyum maruziyetinde, sinir sisteminin karmaşık fonksiyonlardan olan kognitif fonksiyonlarla ilgili yapılmış çalışmalar da, bulgularımızı destekler niteliktedir (15,16,17).

Kaynaklar

1. ATSDR. 1993. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for cadmium. Prepared under contract No. 205-88-0606 for: US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA: ATSDR.
2. Blistrabas RI, Gutman AM, Kuras AV, Mitskis A, Khusainovene NP. Effects of cadmium ions on synaptic transmission in the frog tectum. *Neurophysiology* 1989; 21(6):532-539.
3. Institóris L, Papp A, Siroki O, Banerjee BD, Dési I. Immuno- and neurotoxicological investigation of combined subacute exposure with the carbamate pesticide propoxur and cadmium in rats. *Toxicology* 2002;178(2):161-713.
4. Chow RH. Cadmium block of squid calcium currents. Macroscopic data and a kinetic model. *J Gen Physiol* 1991;98(4):751-70.
5. Devi M, Fingerman M. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995;55(5):746-50.
6. Papp A, Nagymajtényi L, Dési I. A study on electrophysiological effects of subchronic cadmium treatment in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003;13(3):181-186.
7. Yargıçoğlu P, Ağar A, Sentürk Ü, Uysal N, Kılıç D. The Effect of Pre-and Postnatal Cd Exposure on Conduction Velocity in Sciatic Nerve. *Turk J Med Sci* 1998; 28(1): 47-52.
8. Goering PL, Klaassen CD. Resistance to cadmium-induced hepatotoxicity in immature rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1984;74(3):321-329.
9. Hobson M, Milhouse McD, Rajanna B. Effects of cadmium on the uptake of dopamine and norepinephrine in rat brain synaptosomes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1986;37: 421-426.
10. Soliakov L, Wonnacott S. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels involved in nicotinic receptor-mediated [3H] dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem* 1996;67(1):163-70.
11. Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* 1993; 11;366(6451):158-61.
12. Taşçı N, Genç O, Bağırıcı F. The role of L-type calcium channels in spinal reflex responses in cats. *Neuroscience Research Communications* 2003;33(2):124-131.
13. Molnár G, Salánki J, Kiss T. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Research* 2004;22, 1008 (2)205-211.
14. Arito H, Sudo A, Suzuki Y. Aggressive behavior of the rat induced by repeated administration of cadmium. *Toxicol Lett* 1981;7(6):457-61.
15. Gonçalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG ve ark. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 2010;186(1):53-60.
16. Gao S, Jin Y, Unverzagt FW, Ma F, Hall KS, Murrell JR ve ark. Trace element levels and cognitive function in rural elderly Chinese. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;63(6):635-41.
17. Emsley CL, Gao S, Li Y, Liang C, Ji R, Hall KS ve ark. Trace element levels in drinking water and cognitive function among elderly Chinese. *Am J Epidemiol* 2000, 1;151(9):913-20.