

TOKSIČNI EFEKAT KADMIJUMA NA EPITEL
INICIJALNOG SEGMENTA EPIDIDIMISA NAKON
PRETHODNE PRIMJENE NIKOTINA

M. Hrnjičević¹, A. Pleho², I. Šuško¹ i H. Tanović¹

*Institut za histologiju i embriologiju¹ i Institut za patološku fiziologiju²
Medicinskog fakulteta u Sarajevu, Sarajevo*

(Primitljeno 27. II. 1987)

Određivan je učinak prethodne primjene nikotina na ispoljavanje toksičnosti jednokratne visoke doze kadmijuma na epitel inicijalnog segmenta epididimisa pacova.

Davanje nikotina je trajalo šest dana. Prva tri dana eksperimentalne životinje su dobijale i.p. po 1 mg/kg tjelesne težine vodenu otopinu nikotina a druga tri dana po 2 mg/kg težine. Šestog dana sa nikotinom je injicirano 4,58 mg/kg tjelesne težine kadmijuma. Kontrolne životinje su u istom periodu i na isti način dobijale fiziološku otopinu. Životinje su žrtvovane dekapitacijom dvanaest dana od posljednje injekcije.

Sa histoloških preparata planimetrijski je određena površina koja pripada epitelu, intersticiju i lumenima presjeka ispitivanog segmenta epididimisa kao i zapremina jedara glavnih ćelija epitela.

Histološkom analizom konstatovana je snažna vakuolizacija citoplazme glavnih ćelija i skraćenje stereocilija a statističkom obradom brojčanih podataka signifikantno smanjenje volumena jedara glavnih ćelija i površine epitela u odnosu na kontrolne životinje.

Dobijeni rezultati su uspoređeni sa onim utvrđenim u identičnim eksperimentalnim uslovima nakon primjene samo nikotina odnosno samo kadmijuma.

U ranijim radovima saopšteni su pojedinačni efekti primjene nikotina i kadmijuma na epitel početnog dijela duktusa epididimisa pacova i u oba slučaja konstatovane su značajne morfološke promjene (1, 2). U ovom istraživanju, kao i u pomenutim radovima, za početni dio epididimičnog kanala upotrijebljen je naziv inicijalni segment epididimisa pošto je, zahvaljujući radovima (3, 4) kao takav prihvaćen u literaturi.

Poznato je da paralelno davanje dviju ili više biološki aktivnih supstanci može u organizmu proizvesti jači (5, 6, 7, 8) ili slabiji efekat od onog koji bi izazvale aplicirane pojedinačno (9, 10). Polazeći od ovih nalaza, željeli smo da ustanovimo reakciju epitela epididimisa u uslovima kombinovanog davanja nikotina i kadmijuma, primjenjujući identičan eksperimentalni model kao

kod ispitivanja efekta davanja pomenutih supstanci odvojeno, svake za sebe. Opisujući učinak udruženog davanja nikotina i kadmijuma na testis (11) konstatovano je da nikotin selektivno napada intersticijalno tkivo a kadmijum zametni epitel ovog organa. Mogućnost da promjene nastale primarno u testisu, u ovim eksperimentalnim uslovima, indirektno modeliraju ili čak poništavaju promjene izazvane direktnim djelovanjem apliciranih supstanci, izbjegnuta je, kako u ovom tako i u ranijim istraživanjima, izborom za analizu samo inicijalnog segmenta duktusa epididimisa. Naime, zahvaljujući radovima mnogih autora (3, 4, 12, 13) poznato je da su morfofunkcionalna svojstva epitela srednjeg i završnog segmenta ovog organa pod snažnim uplivom testikularnih androgena, naročito onih iz intraluminalnog sadržaja.

Pošto se, po mišljenju ovih autora, inicijalni segment epididimisa ne nalazi pod kontrolom testisa, eventualne promjene u njegovom epitelu bi se, sa velikom vjerovatnoćom, mogle pripisati direktnom efektu apliciranih supstanci.

Cilj ovog istraživanja je da utvrdi: kako se šestodnevna administracija nikotina udružena sa jednokratnom, visokom, dozom kadmijuma odražava na epitel inicijalnog segmenta duktusa epididimisa. Indirektno, istraživanje bi trebalo da odgovori na pitanje da li prethodni tretman nikotinom mijenja reakciju ispitivanog epitela na jednokratno davanje visoke doze kadmijuma. U histološkoj analizi epitela inicijalnog segmenta epididimisa naročita pažnja je posvećena glavnim ćelijama. Prisustvo uskih ćelija (narrow cells), koje se nalaze isključivo u epitelu ovog dijela epididimisa (4), korišteno je za njegovu identifikaciju. Zapažanja o ostalim ćelijama iz sastava epitela samo su uzgredna.

MATERIJAL I METODE

Eksperiment je izveden na pacovima Wistar soja, muškog pola, tjelesne težine od 150—200 g. Uslovi smještaja: temperatura prostorije, količina svjetla, smjena tame i mraka — bili su istovjetni za sve životinje. Životinje su dobijale hranu istog kvaliteta a vodu su uzimale *ad libitum*. U oglednoj i kontrolnoj grupi bilo je po osam pacova. Životinje ogledne grupe su šest dana dobijale vodenu otopinu nikotina, intraperitonealno. U toku prva tri dana injiciran je po 1 mg/kg tjelesne težine a druga tri dana 2 mg/kg tjelesne težine. Šestoga dana sa nikotinom je injiciran i kadmijum u dozi 4,58 mg/kg tjelesne težine. Kontrolna grupa životinja je na isti način primala fiziološku otopinu.

Dvanaest dana nakon posljednje injekcije životinje su žrtvovane dekapitacijom. Uzeti su testisi sa epididimisom, fiksirani u Bouinovoju otopini, kalupljeni u parafinu i poprečno serijski sječeni na krišćice debljine 4—6 mikrometara a zatim rezovi bojeni hematoksilin-eozinom.

Za dalju obradu uzeti su samo oni preparati na kojima je u epitelu utvrđeno prisustvo uskih ćelija (narrow cells). Tako izdvojeni preparati korišteni su za histološku analizu, planimetrijsku obradu i volumetriju jedara. Za planimetrijsku obradu, nakon što je konstatovano da se na cijelom vidnom polju mikroskopa nalaze presjeci ispitivanog dijela epididimisa, pomoću camerae lucidae na listovima papira ograničena su područja koja pripadaju

epitelu, intersticijumu i lumenu. Od svake životinje korišteno je u tu svrhu 6–7 slučajno odabranih preparata, tako da je za svaku grupu životinja napravljeno po 50 crteža sa 50 različitih vidnih polja pri povećanju mikroskopa 10×40 .

Listovi papira su bili jednakih dimenzija, $14,8\times 20,8$ cm i površine $311,4$ cm². Njihove dimenzije su bile takve da su u cijelosti mogli stati u vidno polje s tim da im uglovi dosežu tačno do njegove periferije. Planimetrom marke MOM izmjerena je površina ograničenih područja koja pripada epitelu, intersticiju i lumenu na svakom crtežu (listiću papira). Tako dobijene numeričke vrijednosti izražene u planimetrijskim jedinicama potom su preračunate u kvadratne centimetre. Od tako dobijenih podataka, za svaki promatrani parametar (epitel, intersticij, lumen) izračunata je srednja vrijednost, kako za kontrolnu tako i za oglednu grupu životinja.

Primjenom t-testa po Studentu testirana je signifikantnost dobijene razlike srednjih vrijednosti za životinje kontrolne i ogledne grupe.

Ovako koncipirana primjena planimetrije ima za cilj da se objektivno provjere zapažanja o visini epitela i zastupljenosti intersticija dobijenih histološkom analizom preparata. Planimetrijski postupak omogućuje da se preko određivanja površine koja pripada epitelu, na crtežima presjeka epididimičnog kanala, indirektno zaključuje o njegovoj visini pošto je tako dobijena površina upravo proporcionalna visini epitela. Isti histološki preparati su korišteni za volumetriju jedara glavnih ćelija epitela epididimisa kao i za uobičajenu histološku analizu.

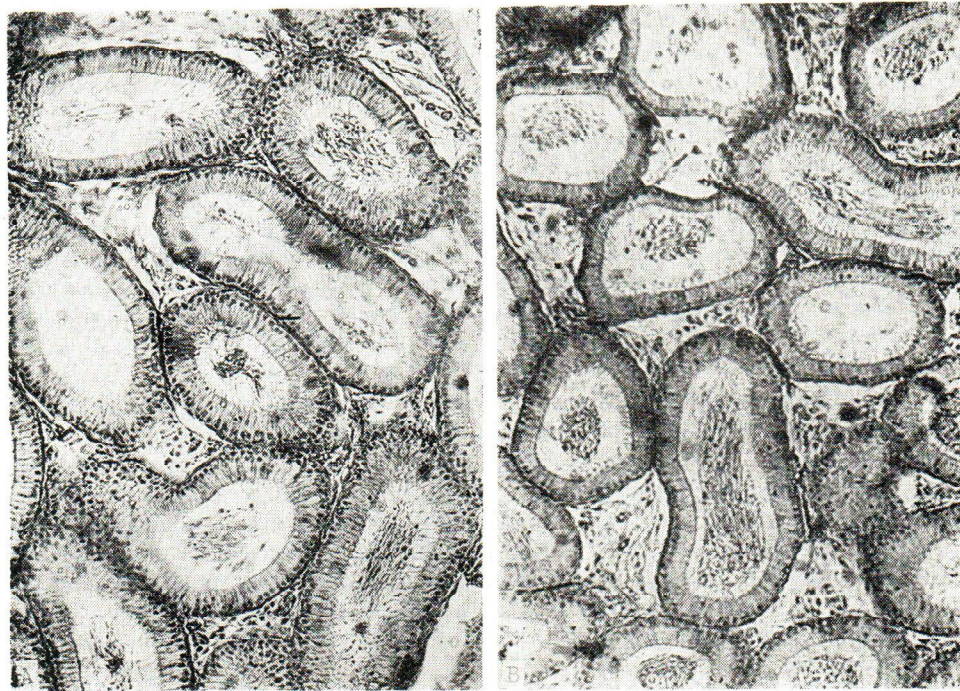
Za procjenu volumetrijskih vrijednosti mjerena su dva dijametra u 200 jedara i primjenom odgovarajuće formule ($V = 1/6 a^2 \times b \times \pi$) određena njihova zapremina. Izračunate su srednje vrijednosti za životinje kontrolne i ogledne grupe a zatim su upoređene kao i u obradi planimetrijskih podataka.

REZULTATI

Histološka analiza

Uporedna histološka analiza epitela inicijalnog segmenta epididimisa kontrolnih i oglednih životinja mješavinom nikotina i kadmijuma pokazuje da je u ovim posljednjim epitel niži, svjetliji sa stereocilijama koje su kraće, malobrojnije i međusobno slijepljene (slika 1). Jedra glavnih ćelija su manja, ponekad nepravilnog oblika, zadebljane jedarne membrane i grubljeg zrnatog hromatina. Citoplazma im je svjetlija sa brojnim vakuolama različite veličine i svijetlog sadržaja. Vakuole su brojnije i veće u bazalnom a naročito srednjem dijelu ćelije koji je proširen i trbušast dajući im karakterističan izgled (slika 2). U ćelijama sa jako izraženom vakuolizacijom, granice ćelije se jasno ocrtavaju. Apikalni polovi glavnih ćelija su tamniji, ispupčeni, zaobljeni ili šiljasti, što površini epitela daje valovit ili zupčast izgled.

Apikalne ćelije su malobrojnije u epitelu oglednih životinja a citološke odlike su veoma slične glavnim ćelijama iste grupe. Broj i citološke karakteristike uskih ćelija kao da se bitnije ne razlikuju u kontrolnih i oglednih životinja. Ipak, zbog opisanih promjena u glavnim ćelijama lakše se uočavaju u epitelu oglednih životinja.



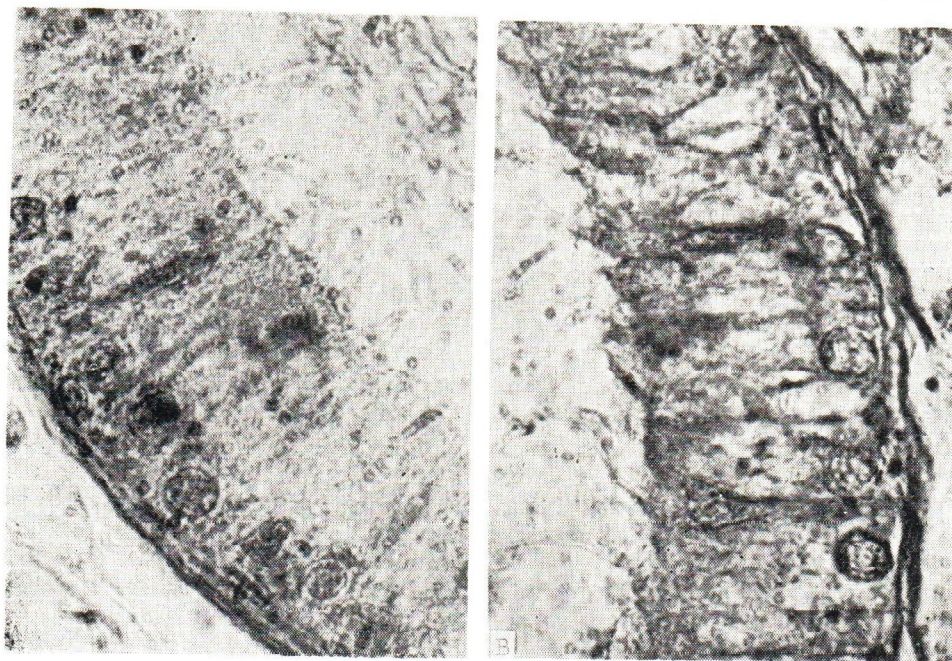
Sl. 1. — Inicijalni segment epididimisa. A. Kontrolni pacov B. Ogladni pacov (tretiran nikotinom i kadmijumom). Epitel niži i svjetliji, jedra sitnija, stereocilije kraće (Bouin, hematoxilin-eozin, 8×10).

Volumetrija glavnih ćelija

Rezultati statističke obrade numeričkih podataka prosječne veličine volumena jedara glavnih ćelija epitela inicijalnog segmenta epididimisa kontrolnih i oglednih životinja prikazani su u tabeli 1. Iz tabele se vidi da je srednja vrijednost volumena jedara pomenutih ćelija sa 48,94 kuba mikrometra u kontrolnih životinja pala na 42,55 kubna mikrometra u oglednih životinja. Statističko testiranje dobijene razlike prosječnog volumena jedara glavnih ćelija pokazuje da tretman mješavinom nikotina i kadmijuma izaziva signifikantno smanjenje volumena jedara ovih ćelija.

Planimetrija

Analizom planimetrijski dobijenih podataka o površinama koje pripadaju epitelu, intersticiju i lumenu, ustanovljeno je da primjena nikotina i kadmijuma ima za posljedicu značajno smanjenje epitela u korist povećanja lumena, u odnosu na kontrolu. Iz tabele 2. se vidi da je dobijena razlika srednjih vrijednosti za epitel statistički signifikantna ($p < 0,01$).



Sl. 2. — Epitel inicijalnog segmenta epididimisa. A. Kontrolni pacov B. Ogladni pacov (tretiran nikotinom i kadmijumom). Epitel niži, snažna vakuolizacija citoplazme glavnih ćelija osobito u srednjem, proširenom dijelu, jedra manja, nepravilnog oblika, grubljeg hromatina. Uska ćelija tamnija, lakše uočljiva. (Bovin, hematoksilin-eozin, 8×100).

Tabela 1.

Efekat šestodnevne aplikacije nikotina i jednokratne doze kadmijuma na volumen jedara glavnih ćelija epitela inicijalnog segmenta epididimisa pacova.

	\bar{X} (μm^3)	SEM	P
Kontrola	48,94	$\pm 0,68$	
Nikotin + Kadmijum	42,55	$\pm 0,74$	< 0,001

DISKUSIJA

Promjene toksičnog djelovanja kadmijuma nakon prethodnog davanja nikotina ispoljavale su se, prije svega, u smanjenju visine epitela (što je indirektno potvrđeno rezultatima planimetrije), signifikantnim smanjenjem volumena jedara glavnih ćelija epitela, drastično izraženom vakuolizacijom njihove cito-

Tabela 2.

Efekat šestodnevne aplikacije nikotina u kombinaciji sa jednokratnom dozom kadmijuma na planimetrijski određenu površinu koja pripada epitelu, intersticiju i lumen na crtežima poprečnog presjeka inicijalnog segmenta epididimisa pacova ($\bar{X} \pm SEM$)

Grupa	Epitel	Intersticij	Lumen
		$\bar{X} \pm SEM \text{ cm}^2$	
Kontrola	91,21 \pm 4,8	42,93 \pm 4,43	178 \pm 7,35
Nikotin + Kadmijum	75,37 \pm 5,05 ^a	42,17 \pm 5,70	194 \pm 6,24

a) signifikantna razlika u odnosu na kontrolu, $p < 0,01$

plazme, smanjenjem broja stereocilija, njihovim skraćivanjem i međusobnim sljepljivanjem u vidu kratkih i grubih pramenova.

Analizirajući učinak šestodnevne primjene samo nikotina u dozi i na način istovjetan sadašnjem istraživanju, na epitel inicijalnog segmenta epididimisa pacova (1) opisali smo intracelularne promjene koje se manifestuju pojavom izražene vakuolizacije citoplazme u bazalnom dijelu epitelnih ćelija, smanjenjem visine epitela i zapremine jedara glavnih ćelija. Imajući u vidu da je vakuolizacija citoplazme nakon davanja nikotina opisana i u endotelnim ćelijama aorte *in vivo* kao i u kulturi njenog endotela (14) moglo bi se pretpostaviti da su ove promjene odraz specifične reakcije epitelnih ćelija na toksično djelovanje nikotina. Kako je vakuolizacija citoplazme epitelnih ćelija znatno intenzivnija u životinja tretiranih uz nikotin i visokom dozom kadmijuma, smatramo da je prisustvo kadmijuma pojačalo toksični efekat nikotina.

Određivanjem selektivnog toksičnog djelovanja kadmijuma na testis i epididimis, *Francavilla i saradnici* (15) ističu njegov toksični učinak primarno na endotel krvnih žila tih organa, a tek sekundarno, remeteći ishranu, na njihov epitel. Taj svoj efekat kadmijum ispoljava selektivno; čak se i u okviru epididimisa opisuju tzv. zaštićene zone u kojima se toksični efekat slabije ispoljava i druge gdje je intenzitet toksične reakcije mnogo jači (15).

Davanjem jednokratne, visoke doze kadmijuma eksperimentalnim životinjama, u količini i na način kao u ovom istraživanju, ali bez prethodne primjene nikotina (2) uzrokovane su promjene glavnih ćelija epitela epididimisa sa karakteristikama: sitno zrnatom citoplazmom, piknozom i deformacijom jedara kao i prisustvom ćelija sa nepromijenjenim citološkim karakteristikama. Pošto ovakve promjene nismo našli u sadašnjem istraživanju, moglo bi se pretpostaviti da je prethodno davanje nikotina izmijenilo reakciju glavnih ćelija epitela ispitivanog dijela epididimisa na ispoljavanje toksičnosti kadmijuma.

Iako je dobro poznato selektivno toksično djelovanje kadmijuma na testis (16, 17) ipak se promjene u testisu ne mogu dovesti u vezu sa promjenama u epitelu inicijalnog segmenta epididimisa, vodeći računa o njihovoj funkcionalnoj neovisnosti (3, 4, 12, 13).

Opisane morfološke promjene u epitelnim ćelijama epididimisa mogle bi se razmatrati u svjetlu rezultata o značaju hipofize u usmjeravanju reaktivnosti monooksidaznog sistema nakon davanja kadmijuma (18); pojačane sinteze »tionein mRNA« u hepatocitima (19) i bubrezima (20); sposobnosti kadmijuma da se pojavljuje kao konkurent ionima kalcija u srčanim mišićnim ćelijama (21) te u svjetlu povećanja broja poliploidnih jedara u hepatocitima kao odgovor na toksične efekte kadmijuma (22). I na kraju, trebalo bi razmatrati dobro poznato svojstvo kadmijuma da inaktivira enzime, blokirajući njihove SH skupine.

Literatura

1. Hrnjičević, M., Pleho, A., Šuško, I., Tanović, H.: Changes in the epithelium of the rat epididymis initial segment after a six-days' administration of nicotine: A histophysiological and planimetric study. *Fol. Med. Saraev.*, 19 (1984) 105—113.
2. Hrnjičević, M., Šuško, I., Pleho, A., Tanović, H.: Histophysiological and morphometric characteristics of the initial segment of rat's epididymis under conditions of cadmium intoxication. *Fol. Anat. Yugosl.* 14 (1984) 49—57.
3. Sun, E. L., Flickinger, C. J.: Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am. J. Anat.*, 154 (1979) 27—56.
4. Sun, E. L., Flickinger, C. J.: Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.*, 196 (1980) 285—293.
5. Behari, J. R., Tandon, S. K.: Effect of zinc on cadmium, copper and zinc contents in cadmium exposed rats. *Toxicol. Lett.*, 5 (1980) 151—154.
6. Stern, P., Gašparović, I.: A contribution to the pharmacology of tremorine induced tremor. *Biochem. Pharmacol.*, 8 (1961) 26.
7. Pleho, A., Stanković, D., Bešlagić, R.: Toxicity of manganese and nicotine mixture and its effect on the blood cholinesterase activity. *Fol. Med. Saraev.*, 9 (1974) 199—205.
8. Pleho, A., Tafro, Š.: Efekti potenciranja — mogući razlog za različite posljedice pri ekspoziciji toksičnim materijalima u zaposlenih. Kongres ljekara BiH, Sarajevo, 1975. Zbornik radova. *Med. arhiv*, 2 (1977) 259—260.
9. Parizek, J.: The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.*, 15 (1957) 56—63.
10. Pleho, A., Bešlagić, R.: Protective effects of nicotine in acute lethal intoxication of rats with copper. *Fol. Med. Saraev.*, 1 (1974) 121—125.
11. Pleho, A., Hrnjičević, M., Tanović, H., Šuško, I.: Determination of toxic effect of nicotine and some metals in the seminiferous epithelium and interstitial tissue of rats testicle by the planimetric method. *Fol. Anat. Yugosl.*, 13 (1983) 1—8.
12. Moore, H. D. M., Bedford, J. M.: The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.*, 193 (1979) 313—327.
13. Moore, H. D. M., Bedford, J.: Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.*, 193 (1979) 293—311.
14. Booyse, F. M., Osikowitz, G., Quarfoot, A. J.: Effect of chronic oral consumption of nicotine on the rabbit aortic endothelium. *Am. J. Pathol.*, 102 (1981) 229—238.
15. Francavilla, S., Moscardelli, S., Francavilla, F., Casastanta, N., Proparzi, G., Martini, M., Santiemma, V.: Acute cadmium intoxication: Influence of ciproterone acetate on the testis and epididymis of the rat. *Arch. Androl.*, 6 (1981) 1—11.
16. Zielinska-Psujka, B., Malendowicz, L. K., Senezuk, W.: Studies on the toxic effect of cadmium in the rat testicular changes induced by a single subcutaneous injection of cadmium chloride. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 6 (1976) 1063—1073.

17. Aoki, A., Hoffer, A. P.: Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.*, 18 (1978) 579—591.
18. Lui, E. M. K., Lucier, G. W.: Hypophysial regulation of cadmium-induced depression of the hepatic monooxygenase system in the rat. *Molecul. Pharmacol.*, 20 (1981) 165—171.
19. Bryan, S. E., Hidalgo, H. A., Koppa, V., Smith, H. A.: Cadmium, an effector in the synthesis of thionein. *Environ. Health Persp.*, 28 (1979) 281—285.
20. Suzuki, K. T., Yamamura, M.: Degradation and re-synthesis of injected liver cadmium-thioneins in rat kidney. *Biochem. Pharmacol.*, 28 (1979) 1806—1807.
21. Pilati, Ch. F., Ewing, K. L., Paradise, N. F.: Effects of cadmium on contractility and calcium concentration in isolated heart muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 169 (1982) 480—486.
22. Peereboom-Stegeman, J. H. J. C., Morselt, A. F. W.: Increase in liver cell nuclear size after chronic cadmium treatment. *Arch. Toxicol.*, 48 (1981) 209—211.

Summary

CADMIUM TOXICITY IN THE EPITHELIUM OF THE INITIAL EPIDIDYMIS SEGMENT AFTER NICOTINE PRETREATMENT

The paper deals with the effects of nicotine pretreatment on the occurrence of degenerative changes in the epithelium of the initial epididymis segment resulting from a single administration of a high cadmium dose. The nicotine pretreatment lasted six days. During the first three days the experimental animals were administered i.p. 1 mg/kg of nicotine water solution each, and during the following three days a dose of 2 mg/kg body weight. On the sixth day they received an injection of 4.58 mg/kg body weight of cadmium with nicotine. During the same period the control animals were given a physiological solution in the same manner. The animals were killed by decapitation twelve days after final injection.

The histological sections were used for a planimetric determination of the surface areas belonging to the epithelium, interstitium and lumen of the epididymal duct and for volumetric analysis of the principal epithelial cell nuclei.

Histological analysis showed prominent vacuolization of the principal cell cytoplasm, shortened stereociliae, a significantly decreased surface area belonging to the epithelium as well as a decrease in the principal cell nuclei volume as compared with control animals.

The results were compared with those obtained in another experiment under identical experimental conditions following administration only of nicotine or cadmium.

Medical Faculty, Sarajevo

*Received for publication
February 27, 1987*