

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL BAKIR ZEHİRLENMESİNDE
PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

Yonca Betil KABAK

Samsun
2010 - Aralık

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL BAKIR ZEHİRLENMESİNDE
PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
ÇALIŞMALAR**

DOKTORA TEZİ

Yonca Betil KABAK

DANIŞMAN: Prof.Dr. M.Yavuz GÜLBAHAR

Samsun
2010 – Aralık

Bu araştırma projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca VET-066 numarasıyla desteklenmiştir.

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

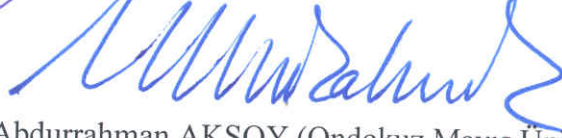
Bu çalışma jürimiz tarafından Patoloji (Veteriner) Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan: Prof.Dr. Rıfki HAZIROĞLU (Ankara Üniversitesi)



Üye: Prof.Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)



Üye: Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)



Üye: Prof.Dr. Tolga GÜVENÇ (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)



Üye: Doç.Dr. Murat YARIM (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Tezin Adı: Ratlarda deneysel bakır zehirlenmesinde patolojik ve imunohistokimyasal çalışmalar.

Tezi Teslim Eden: Yonca Betil KABAK

Tez Savunma Sınav Tarihi: 24.12.2010

Tez Danışmanı: Prof.Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr.Süleyman KAPLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yetiştiren ve her zaman bana destek olan danışman hocam sayın Prof.Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR'a, bilgi ve becerilerini bana aktaran hocalarım sayın Prof.Dr. Tolga GÜVENÇ ve sayın Doç.Dr. Murat YARIM'a, yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Araş.Gör. M. Önder KARAYİĞİT'e,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı OMÜ Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Öğretim Üyesi sayın Doç.Dr. Coşkun GÜLSER'e, Samsun Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden sayın Dr. Neslihan ORMANCI'ya, OMÜ Veteriner Fakültesi Farmakolji-Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY ve sayın Yrd.Doç.Dr. Oğuzhan YAVUZ'a, OMÜ Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Zehra SELÇUK'a, OMÜ Veteriner Fakültesi İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Serhat ARSLAN'a,

Tezimin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

RATLARDA DENEYSEL BAKIR ZEHİRLENMESİNDE PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Yonca Betil KABAK, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Aralık - 2010

Bakır, pek çok enzimin fonksiyon yapabilmesi için gerekli iz elementlerden biridir. Mitokondrial solunum, demir Emilimi, serbest radikallerin tutulumu, elastinle çapraz bağ oluşumu gibi hücre fizyolojisi için önemli olan birçok enzimin yapısında yer almaktadır.

Bakır, elektrik ve boya sanayinde, tesisat borularının üretiminde kullanılırken, veteriner hekimlikte bakır tuzları antelmintik, bağ ve meyve ağaçlarında antifungal olarak geniş kullanım alanına sahiptir. Bu nedenle bakır zehirlenmelerine hayvanlarda rastlanılmaktadır. Bu çalışmada bakır zehirlenmesinde Copper transporter 1 (Ctr1), ATP7B, metallothionein (MT) ve bakır/çinko Süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD)'ın ekspresyonları ile farklı dokulardaki apoptozisin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 56 adet erkek, erişkin, Sprague-Dawley ırkı rat (ortalama ağırlıkları 280 ± 50 g) kullanıldı. Her grupta 14 adet rat olmak üzere iki deneme ve deneme grupları için ayrı ayrı iki kontrol grubu oluşturuldu. CuSO_4 solüsyonu I. deneme grubundaki ratlara günlük 75 mg/kg dozda ve 14 gün süreyle, II. deneme grubundakilere ise aynı dozda 28 gün süreyle gastrik sonda ile uygulandı. Bu süreler sonunda eter anestezisi altında ötenazileri yapıldı. Nekropside ratlardan karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokuları alındı. Dokulardan hazırlanan kesitler hematoksil-eozin, rodanin, Periodik asit-Schiff teknikleri ile boyanarak değerlendirildi. Bu dokularda Ctr1, ATP7B, MT, Cu/Zn SOD, kaspaz-9, -8, -3 varlığı immunoperoksidaz tekniği ile incelendi. Dokulardaki apoptozisi belirlemek üzere TUNEL metodu uygulandı.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre bakır zehirlenmesinin süreye bağlı olarak farklı organ ve dokularda farklı etkiler gösterdiği, bireysel farklılıkların karaciğerde bakır birikimini etkileyebildiği belirlendi. Fazla bakırın akut dönemde karaciğeri, subkronik dönemde böbreği daha fazla etkilediği, akciğer, dalak, beyin ve

beyincik dokularını ise uygulanan bu dozlarda ışık mikroskopik olarak etkilemediği tespit edildi. Zehirlenmenin subkronik döneminde ratların karaciğerinde bakıra adaptasyonun geliştiği sonucuna varıldı.

Ctr1 proteininin hepatositlerdeki lokalizasyonunun ortamdaki bakır miktarına göre değişiklik gösterebildiği, ancak bu durumun böbrek, dalak, mide- bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokuları için geçerli olmadığı görülmüştür. Bu durum, Ctr1'in doku spesifik fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmüştür. ATP7B'nin ise farklı dokularda ortamdaki bakır miktarına göre ekspresyonu ve hücredeki lokalizasyonunun değişebildiği görüldü. Bakır metabolizmasında görev alan MT ve Cu/Zn SOD'ın ortamdaki bakır miktarlarına göre yoğunlukları ve hücredeki lokalizasyonlarında değişiklikler olduğu belirlendi. Bunun da hücrenin bakır birikimine karşı geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olabileceği sonucuna varıldı.

Bakır zehirlenmesinde dokularda hücrelerin hem apoptozis hem de nekroza gidebildiği ancak akut dönemde apoptotik hücrelerin, subkronik dönemde nekrotik hücrelerin daha fazla olduğu görüldü. Zehirlenmenin akut döneminde karaciğer hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla apoptozise uğrarken, böbrek ve beyin dokularının intrinsik yolu kullandığı, kalbin ise hem akut hem de kronik dönemde her iki yol ile apoptozise gittiği sonucuna varıldı

Anahtar kelimeler: Apoptozis, ATP7B, bakır, Ctr1, Cu/Zn SOD, immunohistokimya, MT, rat, rodanin, zehirlenme, TUNEL

ABSTRACT
PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES IN
EXPERIMENTAL COPPER TOXICITY IN RATS

Yonca Betil KABAK, Ph.D. Thesis

University of Ondokuz Mayıs, Samsun, December - 2010

Copper is an essential trace element for most of the metabolic processes in living organisms. Enzymes are dependent on copper to sustain their proper functioning. Copper is also a constituent of many important enzymes involved in cell physiology such as mitochondrial respiration, iron absorption, free radical capture and cross-link formation with elastin.

Copper is used in electric and paint industry and installation pipes, while copper salts has a wide utilization field in veterinary medicine such as antelmentics and antifungal for fruit trees and vineyards. As a result, copper poisoning is commonly observed in animals. In this study, Copper transporter 1 (Ctr1), ATP7B, metallothionein (MT) and copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) which are involved in copper metabolism and apoptosis in different tissue were investigated for expressions during copper toxication.

In the study, 56 adult, male, Sprague-Dawley rats (average weights 280 ± 50 g) were used. Two experimental groups with 14 rats in each and two separate control groups for the experimental groups were composed. During the experimental period, 75 mg/kg CuSO_4 solution was orally administered daily to the rats in the first and second treatment groups for 14 days and for 28 days, respectively. At the end of the designated periods rats were euthanized under ether anaesthesia. Tissues from liver, kidney, spleen, stomach-intestine, lung, heart, cerebrum and cerebellum were obtained during necropsy. Tissue sections were stained by hematoxylin-eosin, rhodanin and periodic acide-Schiff. The presence of Ctr1, ATP7B, MT, Cu/Zn SOD, caspase-9, -8, -3 were investigated by immunoperoxidase technique. Finally, TUNEL method was used to determine the apoptosis in these tissues.

According to the findings obtained in this study, it was determined that copper toxicity leads to different effects in various organs and tissues depending on time. Moreover, individual differences affect copper accumulation in liver. It was also

observed that excess copper affects liver in acute period of toxicity while kidney is more affected in the subchronic period. However, microscopic examination on tissues from lungs, spleen, cerebrum and cerebellum did not reveal any significant effect of excess copper. It was concluded that adaptation for copper was developed in the liver of rats at the subchronic period of toxication.

The localization of Ctr1 protein at hepatocytes was observed to vary due to the copper level in the medium. However, this situation was not observed in other tissues. This specific variation suggests that Ctr1 may have tissue specific function. Additionally, expression and cell localization of ATP7B was observed to vary in different tissues due to the copper level in the medium. The expressions of MT and Cu/Zn SOD, which are involved in copper metabolism, were observed in different concentration and at different cell localizations due to the copper level in the medium. This observation was interpreted as the cell might have developed an adaptation mechanism against copper accumulation.

Tissue cells may undergo to necrosis or apoptosis in copper toxicity. In this study, it was observed that apoptotic cells were predominant at acute period while necrotic cells were predominant at the subchronic period. In addition, it was concluded that, liver undergoes to apoptosis with both intrinsic and extrinsic routes in the acute period of copper toxicity while kidney and cerebral tissues tend only to intrinsic route. Finally, heart tissues were observed to have apoptosis with both intrinsic and extrinsic routes at acute as well as chronic period of copper toxicity.

Key Words: Apoptosis, ATP7B, copper, Ctr1, Cu/Zn SOD, immunohistochemistry, MT, rat, rhodanin, toxicity, TUNEL

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAS	Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
Apaf1	Apoptotic proteaz activating factor1
APP	Amyloid precursor protein
Asm	Asit sfingomyelinaz
Atox1	Antioxidant protein1
Caspase	Cysteine-aspartic protease (Kaspaz)
CCS	SOD ile ilgili metalloşaperon
Ced	<i>Caenorhabditis elegans</i> death
COMMD1	Copper metabolism gen MURR1 domain containing1
COX17	Sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon
Ctr	Copper transporter
Cu	Bakır
CuSO ₄	Bakır sülfat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin tetrahidroklorid
DCT1	Divalent cation transporter1
DMT1	Divalent metal transporter1
FADD	Fas-associated death domain protein
GSH	Glutathione (Glutasyon)
HE	Hematoksilen-eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
LEC	Long Evans Cinnamon
Mg	Magnezyum
MT	Metallothionein (Metallothionein)
Nramp	Natural resistance associated macrophage protein
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH	Hidroksil radikali
PAS	Periodik asit – Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PTP	Permeability transition pore

PrP	Prion protein
ROS	Reaktif oksijen türleri
SABK	Streptavidin biotin peroksidaz kompleks tekniği
SOD	Süperoksit dismutaz
TNF	Tumour receptor superfamily
TRADD	TNF- associated death domain protein
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end Labelling
Zn	Çinko

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DOĞA VE ÇEVREDE BAKIR	2
2.2. BAKIR METABOLİZMASI	2
2.2.1 Diyetle Bakır Alımı ve Emilimi	3
2.2.2 Bakırın Kanda Taşınması	4
2.2.3 Bakırın Hücreye Alınışı	5
2.2.3.1 Copper transporter (Ctr)	6
2.2.3.2 Natural resistance associated macrophage protein (Nramp)	8
2.2.4 Bakırın Hücre İçi Dağıtımı	9
2.2.4.1 Antioksidan protein1 (Atox1)	9
2.2.4.2 Süperoksit dismutazla ilgili metalloşaperon (CCS)	10
2.2.4.3 Sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon (Cox17)	10
2.2.4.4 Glutasyon	11
2.2.4.5 Metallotionein	11
2.2.5 Bakırın Hücreden Atılması	12
2.2.5.1 P-tip ATPazlar: ATP7A ve ATP7B	12
2.3. BAKIRIN ORGANİZMADAKİ GÖREVLERİ	13
2.4. BAKIR ZEHİRLENMESİ	14
2.4.1 Primer Bakır Zehirlenmesi	15
2.4.1.1 Wilson hastalığı	15
2.4.1.2 Wilson hastalığının hayvan modelleri	16
2.4.1.3 Wilson hastalığı dışındaki bakır zehirlenmesi	17
2.4.1.4 Bazı türlerde bakır birikimine eşlik eden primer bilier siroz	17
2.4.2 Sekonder bakır zehirlenmesi	18

2.5. BAKIR ZEHİRLENMESİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI	20
2.5.1 Bakır Zehirlenmesinin Neden Olduğu Reaktif Oksijen Türleri Ve Koruyucu Mekanizmalar	21
2.5.1.1 Bakır zehirlenmesinin neden olduğu reaktif oksijen türleri	21
2.5.1.2 Süperoksit dismutaz	22
2.5.2 Bakır Zehirlenmesine Bağlı Hücre Ölüm Şekilleri	22
2.5.2.1 Nekroz	22
2.5.2.2 Apoptozis	23
2.5.3 Bakır Zehirlenmesi ve Apoptozis	27
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. DENEY HAYVANLARI	29
3.2. BAKIR SÜLFAT SOLÜSYONUNUN HAZIRLANMASI	29
3.3. DENEYSEL ZEHİRLENMENİN OLUŞTURULMASI	29
3.4. DENEME PLANI	29
3.5. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME İÇİN DOKU KESİTLERİNİN HAZIRLANMASI	30
3.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL TEKNİĞİN UYGULANMASI	30
3.7. DOKULARDAKİ APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ	31
3.8. SERUM, YEM VE SU ÖRNEKLERİNDE BAKIR KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ	32
3.8.1 Serumların Hazırlanması	32
3.8.2 Serum Örneklerinin Ölçüme Hazırlanması	33
3.8.3 Yem Örneğinin Ölçüme Hazırlanması	33
3.8.4 Ölçümlerin Yapılması	34
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR	35
4.1. KLİNİK BULGULAR	35
4.2. MAKROSKOBİK BULGULAR	35
4.3. SERUM BAKIR DÜZEYLERİ	35
4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	36
4.4.1 Karaciğer Bulguları	36

4.4.2. Böbrek Bulguları	37
4.4.3. Dalak Bulguları	38
4.4.4. Mide ve Bağırsak Bulguları	38
4.4.5. Kalp Bulguları	38
4.4.6. Akciğer Bulguları	38
4.4.7. Beyin ve Beyincik Bulguları	40
4.5. HİSTOKİMYASAL BULGULAR	41
4.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	45
4.6.1. Ctr1	45
4.6.2 ATP7B	52
4.6.3 Metallotionein	55
4.6.4 Zn/Cu SOD	59
4.6.5 Kaspaz-9	62
4.6.6 Kaspaz-8	67
4.6.7 Kaspaz-3	69
4.6.8 TUNEL metodu ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi	72
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ	96
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	109
OMÜ HAYVAN ETİK KURULU	113

1. GİRİŞ

Bakır; pek çok hücrel enzim fonksiyon yapabilmesi için gerekli iz elementlerden biridir. Mitokondrial solunum, demir emilimi, serbest radikallerin tutulumu, elastinle çapraz bağ oluşumu gibi hücre fizyolojisi için önemli olan birçok enzimin kimyasında katalitik bir kofaktördür. Serbest bakır iyonları hücrel komponentlerin hasar görmesine neden olur. Bakır iyonlarının atılımı ve yeniden alımı arasındaki hassas denge hücrel bakır iyonları ile korunur (Harris, 2003; Sharp, 2003).

Copper transporter 1 (Ctr1) tarafından endositozis ile Cu^+ iyonu halinde hücre içine alınan bakır, karaciğer dışındaki dokularda hücrelerin Golgi ağında bulunan ATP7A (Menkes proteini) genine, karaciğer hepatositlerinde ise ATP7B (Wilson proteini) genine verilir (Arredondo ve Nunez, 2005). ATP7A ve ATP7B genleri hücre içi bakır homeostazisinde hem koruyucu hem de biyosentetik etkiye sahiptir. Hepatosit dışındaki diğer hücrelerde ATP7A ile bakır hücre dışına verilerek, bakıra bağlı lizil oksidaz ve tirozinaz gibi enzimler sentezlenir. Bakır metabolizmasında çok önemli bir görev üstlenmiş olan karaciğer, fazla miktardaki bakırı ATP7B aracılığıyla safraya vermek suretiyle organizmanın zehirlenmesinden korunmasına yardımcı olur. Hepatositlerde ATP7B ile seruloplazminin sentezlenmesi sağlanır. ATP7A ve ATP7B, hücre bakır düzeyi arttığında veziküler kompartmanlar halinde bakırın hücre dışına verilmesinde görevlidir. Bu genlerin bakır homeostazisinde görevleri açıklanmakla birlikte, bu görevlerin nasıl düzenlendiği tam olarak ortaya konamamıştır. Bakırın yüksek konsantrasyonda olduğu ortamlarda bir başka koruyucu faktör metallothioneindir. Antioksidan etkiye sahip olan metallothionein'in en karakteristik özelliklerinden biri fazla miktardaki metal iyonlarını zararsız bir formda tutmaktır. Bakırın fazla bulunduğu ortamlarda bakır ile bağlanan metallothionein, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önleyerek hücrenin korunması sağlar. Fakat koruyucu mekanizmaların yeterli olamadığı durumlarda hücre ölümü kaçınılmazdır (Harris, 2003; Ogra ve ark., 2006; Lutsenko ve ark., 2007).

Bu tezde, ratlarda bakır metabolizmasında görev alan adaptör proteinlerden Ctr1, ATP7B ve antioksidan etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) ile metallothionein (MT) 'in ekspresyonları ayrıca farklı dokulardaki apoptozisin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOĞA VE ÇEVREDE BAKIR

Doğada bakır (Cu) saf element halinde ya da kalkopirit, kalkosit, bornit ve malahit gibi madenler içinde bulunan yaygın bir elementtir. Bakırın kuprik (Cu^{+2}) ve kupröz (Cu^{+1}) formları vardır. Toprakta yaklaşık 50 $\mu\text{g/g}$, içme suyunda 13 ng/ml ve havada 200 ng/m^3 kadar bakır bulunur (Kaya ve ark., 2002; Gerberding, 2004).

Gıda maddelerindeki bakır yoğunlukları farklılık gösterir. Kabuklularda 12- 37 $\mu\text{g/g}$, karaciğerde 4.5- 6 $\mu\text{g/g}$, ette 1 $\mu\text{g/g}$, tahıllarda 3- 8 $\mu\text{g/g}$, sebzelerde 0.3- 3 $\mu\text{g/g}$, meyvelerde 0.4- 1.5 $\mu\text{g/g}$ ve hayvan yemi ve otlarda 8- 10 $\mu\text{g/g}$ bakır bulunur (Kaya ve ark., 2002). Günlük olarak yetişkin bir insan alimenter yolla yaklaşık 0.6- 1.6 mg bakır alır. Tüketilen gıdaların üretildiği ortama göre içerdiği bakır miktarı farklılık gösterebilir. İçme suyu normalde bakır alımına önemli bir katkı sağlamamakla birlikte tesisatta kullanılan korozyona uğramış bakır borular sudaki bakır miktarını önemli ölçüde artırmaktadır (Tapiro ve ark., 2003; Gerberding, 2004; Langner ve Denk, 2004; Wijmenga ve Klomp, 2004). Ayrıca alınan gıdalarda bulunan farklı mineral ve bileşikler de bakır emilimini etkilemektedir (Kaya ve ark. , 2002; Tapiro ve ark., 2003).

Bakır elektrik ve boya sanayinde, tesisat borularının üretiminde kullanılmaktadır. Veteriner hekimlikte bakır tuzları antelmintik olarak, bağ ve meyve ağaçlarında ise fungusit olarak geniş kullanım alanına sahiptir (Kaya ve ark., 2002; Gerberding, 2004). Bakır, solunan havayla, içilen suyla, yenilen yiyeceklerle ya da bakır içeren bileşiklerin deriye teması yoluyla organizmaya alınabilir. Bakırla ilgili en ciddi zehirlenmeler oral yolla olmaktadır (Gerberding, 2004).

2.2. BAKIR METABOLİZMASI

Bakır; pek çok hücrel enzim fonksiyon yapabilmesi için gerekli iz elementlerden biridir. Mitokondrial enerji üretiminde etkili olan bakır, demir homeostazisi, serbest radikallerin detoksifikasyonu, kollojen ve elastinin çapraz bağ oluşturmaları, nörotransmitter sentezi gibi hücre fizyolojisi için önemli olan birçok enzimin kimyasında katalitik bir kofaktördür. Bakır iyonlarının hücreden atılımı ve yeniden alımı arasındaki hassas dengeyi, hücrel bakır iyonları belirler. Biyolojik

sistemlerde; bakır homeostazisi moleküler düzeyde tanımlanır. Bakır metabolizması; glutasyon, metallothionein, Cu-ATPaz olarak bilinen Menkes ve Wilson proteinleri ile bakırın hücre içi kompartmanlara verilmesini sağlayan bakır şaperonları olarak adlandırılan bazı sitoplazmik transport proteinleri tarafından koordine edilir (Karagül ve ark., 2000; Harris, 2003; Sharp, 2003; Tapiero ve ark., 2003; Langner ve Denk, 2004).

Serbest bakır, demir metabolizmasında olduğu gibi membranlarda lipid peroksidasyonundan sorumlu olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine, proteinlerin oksidasyonuna ve RNA sentezinin bozulmasına sebep olur. Bilindiği üzere ROS kanser, sinir sistemi hastalıkları ve yaşlanma gibi birçok farklı patolojilerin gelişmesine katkıda bulunur (Tapiero ve ark., 2003; Valko ve ark., 2005; Jubb ve ark., 2007). Bakır metabolizması ayrıca yangı, enfeksiyon ve kanser gibi durumlardan etkilendir ve serum bakır düzeylerinde yükselmeler görülebilir (Arredondo ve Nunez, 2005).

Bakır zehirlenmesine insan ve hayvanlarda çok sık rastlanmaktadır. Canlı tür ve ırklarının bakıra olan duyarlılıkları farklıdır. Bakır zehirlenmesine en duyarlı tür koyun iken, bakırın çok yüksek düzeylerdeki dozları, kurbağa ve kuğunun karaciğerlerinde hasar oluşturmaz. Ratta ise yüksek konsantrasyondaki bakır önce karaciğer ve böbrekte dejenerasyon oluşturur, ancak bir süre sonra hayvanlar bu duruma adapte olur. Bakır metabolizmasında görülen genetik bozukluklar bakır zehirlenmesini kaçınılmaz hale getirmektedir. Bu şekilde Bedlington terrierlerinde, West Highland White terrierlerinde ve insanlarda Wilson hastalığında karaciğerde bakır birikimi ile progresif karaciğer dejenerasyonu görülür (Fuentealba ve ark., 1989; Harris, 2003; Jubb ve ark., 2007).

2.2.1 Diyetle Bakır Alımı ve Emilimi

Bakır alımı için en önemli yol oral yoldur. İnsan ve hayvanlarda besinlerle alınan bakır, mide ve ince bağırsakta özellikle duodenumdan emilir (Burtis ve Ashwood, 1999; Pena ve ark., 1999; Tapiero ve ark., 2003, Bissig ve ark., 2005; Lutsenko ve ark., 2007). Yetişkin insanlarda günlük bakır alımı ile ilgili değişik bilgiler mevcuttur. Günlük diyetle alınan bakırın %50-80'i emilir. Emilen bakırın yaklaşık %15'i dokulara taşınırken %85'i ise atılır. Bakırın yaklaşık %98'i safra, %2'si ise ter ve idrar yolları ile atılır (Wijemenga ve Klomp, 2004). Bağırsakta bakırın emiliminin nasıl olduğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pena ve ark., 1999; Arredondo ve Nunez,

2005; Lutsenko ve ark., 2007). Bakır emilimi ile ilgili iki farklı mekanizma bildirilmektedir. Bunlardan birincisi; sindirim kanalında bakır konsantrasyonu düşük olduğunda, emilim aktif bir mekanizmayla olur ve mukoza hücrelerinin yüzeyine bakırın kimyasal olarak bağlanması sağlanır. Diğer bir mekanizma ise bağırsakta bakır konsantrasyonu arttığında emilim basit difüzyonla olur (Karagül ve ark., 2000).

Gıdalarla alınan bakırın emilimini, cinsiyet, alınan miktar, bakırın kimyasal yapısı ve gıda içeriği gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Potasyum ve asidik pH bakır emilimini artırırken; çinko, kadmiyum, kurşun, kalsiyum ve molibden gibi metaller emilimini azaltır. Çinko ve kadmiyum, bakır ile aynı taşıyıcı proteine yarışmalı olarak bağlandıklarından, molibden ise bağırsaklarda sülfat varlığında bakır ile şelatlar oluşturduğundan, bakır emilimini azaltmaktadırlar. Demir, bakır emilimini etkilemez, ancak bakır eksikliğinde demir transportu bozulur ve demirin çeşitli dokularda biriktiği görülür. Bakır eksikliği demir üzerinden dolaylı olarak hipokromik mikrositik anemiye neden olur (Burtis ve Ashwood, 1999; Karagül ve ark., 2000; Sharp, 2003; Arredondo ve Nunez, 2005). Ravia ve ark. (2005) ratlarda yaptıkları bir çalışmada demir eksikliğinde diyetteki bakır emiliminin arttığını, karaciğer ve bağırsakta bakır düzeyinin daha yüksek ölçüldüğünü bildirmişlerdir.

2.2.2 Bakırın Kanda Taşınması

Enterositler tarafından emilen bakır, albumin, transküprein ve histidine bağlanarak portal dolaşıma verilir (Linder ve ark., 1998; Langner ve Denk, 2004; Mehta ve ark., 2006; Nyasae ve ark., 2007). Emilen bakırın büyük bir kısmı karaciğere, daha az kısmı ise böbrek ve diğer dokulara taşınır (Linder ve ark., 1998). Karaciğere gelen bakır, büyük oranda seruloplazmine bağlanarak tekrar kana verilir (Lutsenko ve ark., 2007). Bakır ile gevşek bir şekilde bağlanan ve plazmada en fazla bulunan albumin, total plazma bakırının sadece %10-12'sini bağlar (Karagül ve ark., 2000; Tapiero ve ark., 2003;). Albumin ile bakır arasındaki bağ oldukça zayıftır ve albumine bağlı bakıra son zamanlarda “serbest bakır” denmeye başlanmıştır. Albumine bağlı bakır hücresel ihtiyaçları karşılamakla birlikte, düzeyi artarsa zehirlenmeye neden olabilir (Brewer, 2010). Serumdaki bakırın taşınmasında Pena ve ark. (1999) ile Helman ve Gitlin, (2002) seruloplazmin'in %95 oranında etkin olduğu, Mehta ve ark. (2006) ise albumin'in %30, seruloplazmin'in %65, düşük molekül ağırlıklı komplekslerin, özellikle histidin'in %5

oranında etkin olduğunu bildirmektedirler. Başta karaciğer olmak üzere dokulara bakır taşınmasında ana kaynak seruloplazmindir. Ancak karaciğer dışındaki dokulara bakırın taşınmasında seruloplazmin'in yanında albumin, transküprein ve bakır-dihistidin'in de etkin bir görevi vardır (Tapiero ve ark., 2003). Albumin kupröz bakır, seruloplazmin ise küprük bakır taşır (Sullivan ve ark., 1991).

2.2.3 Bakırın Hücreye Alınışı

Bakırın hücre içine alınışını yöneten farklı mekanizmalar ve farklı bileşenler vardır (Harris, 2003; Lutsenko ve ark, 2007). Bunlar, bakırın hücre içine alınmasını sağlayan bazı taşıyıcı membran proteinleri ya da pinositozis olduğu bildirilmektedir (Lutsenko ve ark, 2007). *Copper transporter* (Ctr) ailesinde bulunan bakır taşıyıcı membran proteinleri Cu^{+} 'in, *Natural resistance associated macrophage protein* (Nramp) ailesinde yer alan aslında demirin hücre içine alımından sorumlu olan taşıyıcı membran proteinleri ise Cu^{+2} 'nin de hücre içine alınmasını sağlar (Sharp, 2003; Petris, 2004).

Gıdalardaki bakır Cu^{+} formunda olduğunda doğrudan enterositlerde bulunan Ctr1 tarafından emilir. Ancak Cu^{+2} formundaki bakır ise ya diyetdeki ekzojen indirgeyiciler (askorbat ve ditiyotrietol gibi) veya hücrelerin mikrovilluslarında lokalize olan Steap protein olarak da adlandırılan metalloreduktazlar aracılığıyla Cu^{+} formuna döndürüldükten sonra Ctr1 ile ya da demir emiliminin bozulduğu durumlarda az miktarda da olsa Cu^{+2} formunda Nramp ailesindeki proteinler tarafından hücre içine alınır (Harris, 2003; Sharp, 2003; Petris, 2004; Lönnerdal, 2008). Petris (2004) hücre kültüründe yaptığı bir çalışmada, ortama eklenen antimis A, oligomisin ve sodyum azid gibi metabolik indirgeyiciler sayesinde bakır alımının enerjiye bağlı olmaksızın şekillendiğini ve ayrıca yüksek düzeydeki potasyumun bakır alımını arttırdığını bildirmektedir.

Farklı dokular farklı miktarlarda bakıra sahiptir. Bunun nedeninin, hücre tipine özel bakır alıcı proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaygın nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarına yönelik yapılan çalışmalarda; nöronlara bakır alımından sorumlu olan membran proteinlerinin, *amiloid prekürsor protein* (APP) ile *prion protein* (PrP) olabileceği bildirilmiştir (Camakaris ve ark., 1999; Harris, 2003).

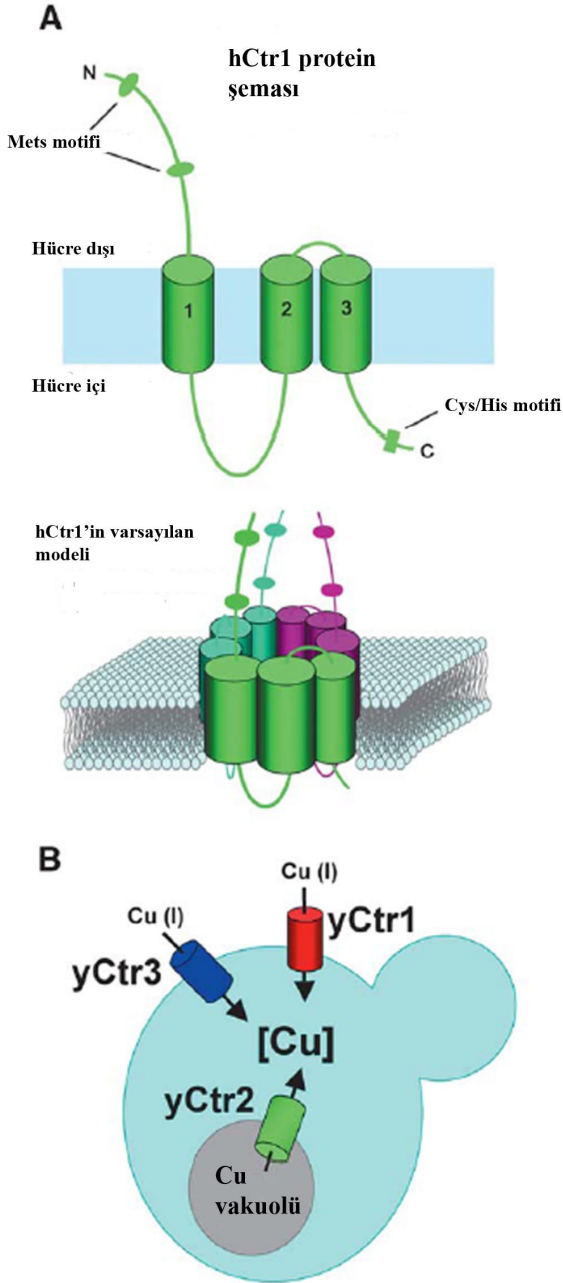
2.2.3.1 Copper transporter (Ctr)

İlk olarak *Saccharomyces cerevisiae* isimli mayada belirlenen bakır taşıyıcı proteinler (yeast copper transporter1= yCtr1 ve yCtr3) ve bakır transport vezikülünde bulunan yCtr2'nin insan ve memeli hayvanlardaki homoloğu sırasıyla, bakır transporter1 (Ctr1) ve bakır transporter2 (Ctr2)'dir (Şekil 1B). yCtr3'ün memelilerde homoloğu yoktur. Rat Ctr1, human bakır transporter1'in (hCtr1) %92 homoloğudur (Holzer ve ark., 2006). RNA blot analizleri Ctr1'in tüm organ ve dokularda, farklı konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir (Pena ve ark., 1999; Lee ve ark, 2001; Sharp, 2003; Samsonov ve ark., 2006). Bağırsaklarda enterositlerin mikrovilluslarında bakırın emilimini sağlayan Ctr1 organizmanın bakır homeostazisinde önemli bir yere sahiptir (Arredondo ve Nunez, 2005; Valko ve ark., 2005). En yüksek düzeyde plasentada, en düşük düzeyde ise karaciğer, ovaryum ve bağırsakta bulunan Ctr2'nin, bakır homeostazisinde rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Ctr2 bakır yetersizliği durumlarında kuproenzimlere bakır sağlamak için transport vezikülü içindeki bakırı harekete geçirdiği düşünülmektedir (Pena ve ark., 1999; Harris, 2003; Petris, 2004).

Tüm Ctr ailesinin, varsayılan yapısal modeline göre N ve C- terminusu ile transmembran kanal olmak üzere üç bölgesi belirlenmiştir (Şekil 1A). Hücre dışı N-terminusu üzerinde taşıdığı metiyoninden zengin ve "Mets motifi" olarak bilinen bölgeler çok sayıda bakır bağlayabilecek yapıdadır. Hücre içi yerleşimli C-terminusunda iyi korunmuş şekilde sistein ve histidin aminoasitleri bulunur. Transmembran kanalı ile bakırın hücre içine alındığı düşünülmektedir. Bakırın Ctr1 ile hücre içine alınması sırasında enerji kullanılmaz (Petris, 2004; Samsonov ve ark., 2006).

Memelilerde bakır homeostazisi ve embriyonik gelişim için Ctr1 kritik role sahiptir. Yetişkin farelerde yapılan bir çalışmada Ctr1 eksikliğinde yapısında bakır bulunan enzimlerin aktivitesinin bozulduğu ve bazı dokularda bakır birikiminin olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark, 2001). Embriyogenezis hücre proliferasyonu açısından çok aktif bir dönemdir ve bu dönemde fazla miktarda sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon (COX) aktivitesine ihtiyaç duyulmaktadır. COX'un aktivitesi Ctr1'in varlığı ile doğru orantılıdır. Ctr1^{-/-} fare embriyolarının intrauterin öldüğü, Ctr1^{+/-} farelerin beyin ve dalaktaki bakır düzeyinin daha düşük, sindirim sistemi, karaciğer ve böbrekteki bakır düzeyinin ise normal olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark, 2001). Ctr1^{+/-}

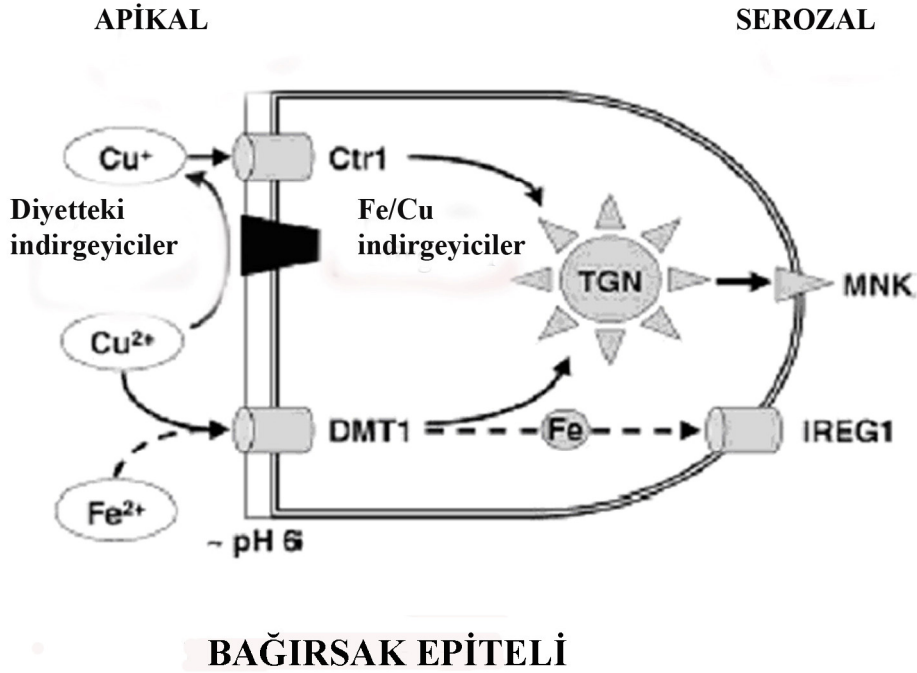
farelerin beyin dokusundaki bakır miktarının önemli ölçüde düşük olması Ctr1'in beyinde bakır alımındaki önemini göstermektedir (Sharp, 2003; Petris, 2004).



Şekil 1: **A-** hCtr1 proteininin yapısal modeli. hCtr1'in trimerizasyonu ile şekillenen bir transmembran kanalının hipotetik çizimi. **B-** *Saccharomyces cerevisiae* ait Ctr ailesinde bulunan proteinlerin hücredeki yerleşimleri (Petris, 2004'den alınmıştır)

2.2.3.2 Natural resistance associated macrophage protein (Nramp)

Natural resistance associated macrophage protein (Nramp) ailesinde yer alan yüksek affiniteli bakır taşıyıcı membran proteinleri Divalent metal transporter1 (DMT1), divalent cation transporter1 (DCT1), natural resistance associated macrophage protein2 (Nramp2)'dir. DMT1, DCT1 ve Nramp2 yaygın doku dağılımına sahip olup, en düşük düzeyde bağırsaklarda, en yüksek düzeyde böbrekte saptanmıştır. DMT1, DCT1 ve Nramp2 aslında demir alınımında tanımlanmış olup, bakır alınımında daha az spesifiktirler (Harris, 2003). Caco-2 hücre kültüründe yapılan bir çalışmada DMT1'in özellikle demir, daha az oranda da bakır, çinko ve mangan gibi metallerin transportunu sağladığı bildirilmektedir (Şekil 2) (Sharp, 2003).



Şekil 2: Bağırsak epitelinden diyetdeki bakırın emilimiyle ilgili geliştirilmiş bir model. Diyetle Cu^{+2} durumunda bulunan bakır enterositlerin apikal yüzeyinden ya divalent metal transporter 1 (DMT1) ile Cu^{+2} olarak ya da çeşitli indirgeyiciler tarafından indirgendikten sonra Copper transporter 1 (Ctr1) ile Cu^+ şeklinde emilir. Absorbe edilen bakır hücre içi şaperonlar aracılığıyla Golgi ağına (TGN) yönlendirilir ve Menkes proteini (MNK= ATP7A) ile hücreden atılır. DMT1 sayesinde emilen demir de enterositlerin bazolateral yüzeyinde lokalize olan iron responsive element (IREG) ile kana verilir (Sharp, 2003' dan alınmıştır).

2.2.4 Bakırın Hücre İçi Dağıtımı

Bakır, Ctr1 tarafından Cu^+ halinde endositozisle hücre içine verilir. Serbest bakır iyonları yüksek reaktif özelliğinden dolayı hücre membranı, proteinler ve nükleik asitlere ciddi zararlar verir (Prohaska ve Gybina, 2004). Bakırın bu zararlı etkisi hücre içinde şaperonlar olarak adlandırılan eriyebilir polipeptidler, bakırı bağlayan proteinler ve Golgiden gelişen veziküller ile kontrol edilir (Harris, 2003; Tapiero ve ark., 2003).

Şaperonlar, bakırı hücre içi alıcı moleküllere taşıyan ve hedefe uygun özellikte olan proteinlerdir (Harris, 2003). Bilinen bazı bakır şaperonları; antioksidan protein1 (Atox1), süperoksit dismutaz ile ilgili metalloşaperon (CCS) ve sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon (Cox17)'dir. Hücre içinde bakırı bağlayan proteinler, glutasyon ve metallothioneindir (Prohaska ve Gybina, 2004).

Golgi kökenli veziküller, plazma membranı veya diğer hücresel yapılarla kaynaşmak suretiyle, Golgi ağının hareket özelliğini de kullanarak kapalı kompartmanlar şeklinde bakırın hücre içinde taşınmasını sağlarlar. İki katlı vezikülün iç membranında bulunan enerji sağlayıcı P-tip ATPazlar sayesinde bakır vezikül içine alınır. Aminoasitler ve proteinlerle bakırın oluşturduğu kompleksler genelde suda çözünürken; bağırsak ve karaciğer hücreleri ile alg ve mantarlar tarafından alınan bakır iyonlarının büyük bir kısmı hücrenin bir bölgesinde lokalize edilir. Hücreler absorbe ettikleri bakırı, transport veziküller içerisinde tutarlar. Bakırın hücre dışına verilmesi için transport veziküller, plazma membranına doğru hareket ederler. Bakırın hücre içi vezikül hareketi, bakır homeostazisini sağlamak içindir ve bakır taşınmasındaki herhangi bir bozukluk, Wilson ve Menkes hastalıklarının oluşmasına yol açar (Harris, 2003; Lutsenko ve ark., 2007).

2.2.4.1 Antioksidan protein1 (Atox1)

Hücre içine alınan bakırın çoğu antioksidan protein-1'e (Atox1) bağlandıktan sonra Golgi ağında lokalize olan P-tip ATPazlara yani ATP7A ve ATP7B genlerine sunulur (Harris, 2003; Lutsenko ve ark., 2007). Mayalardaki homoloğu Atx I olan Atox1, insanda human antioksidan protein homolog-1 (HAH-1) olarak isimlendirilir (Harris, 2003; Prohaska ve Gybina, 2004). Normal embriyonik gelişim için gerekli olan Atox1, dokularda ATP7A ve ATP7B ile aynı bölgede eksprese olması beklenir. Fakat bazı dokularda Atox1'in ATP7A ve ATP7B ile örtüşmediği görülür (Şekil 3) (Cox ve

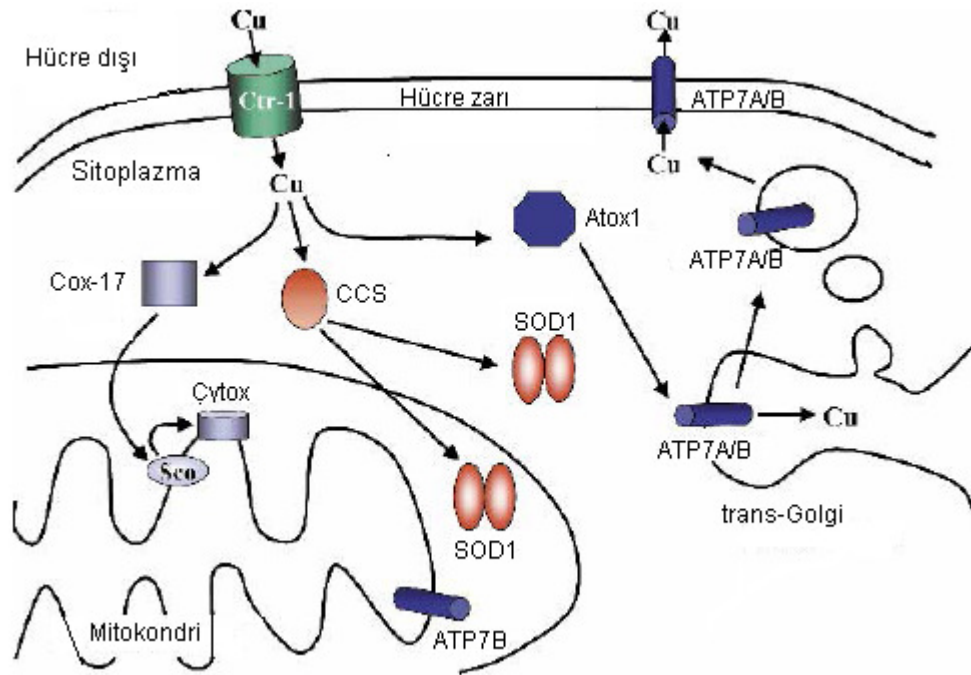
Moore, 2002; Moor ve ark., 2002).

2.2.4.2 Süperoksit dismutazla ilgili metalloşaperon (CCS)

Süperoksit dismutaz ile ilgili metalloşaperon (CCS), süperoksit radikallerine karşı hücreleri koruyan ve sitoplazmadaki Cu/Zn SOD'a bakırı veren metalloşaperondur (Şekil 3) (Harris, 2003; Prohaska ve Gybina, 2004).

2.2.4.3 Sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon (Cox17)

Sitokrom-c oksidazla ilgili metalloşaperon (Cox17), hücre içi solunumda terminal enzim olarak görev yapan sitokrom-c oksidazın sentezi için gerekli bakırın mitokondriye verilmesini sağlayan şaperondur (Şeki 3) (Harris, 2003; Prohaska ve Gybina, 2004).



Şekil 3: Hücre içi bakır metabolizmasının temel şeması. Cu, Cu⁺ olarak hücre içine Ctr1 ile alınır ve bakır şaperonları olarak bilinen Cox-17, CCS, ve Atox1'e verilir. Bakır Cox-17 mitokondrideki sitokrom-c'ye; CCS sitoplazma ve mitokondrideki SOD'a; Atox1 ise Golgi ağındaki ATP7A ve ATP7B'ye taşır. ATP7A ve ATP7B, Golgi ağından Cu'nın transport vezikülleri ile hücre dışına atılmasını sağlar (Rossi ve ark., 2004'dan alınmıştır).

2.2.4.4 Glutasyon

Tripeptid glutasyon (GSH), sadece hücre içi enzim ve proteinlere bakırın transferini ve bağlanmasını sağlayan hücresel bir proteindir. Bakır, hücreye girer girmez metallothioneine veya başka bir proteine bağlanmadan önce, glutasyon ile kompleks oluşturur. Glutasyon, ayrıca metallothioneinden bakırın salınmasını, apo-seruloplazmin ve apo-Cu/Zn SOD'un yenilenmesini de sağlar (Harris, 2003; Mehta ve ark., 2006). *In vitro* çalışmalar glutasyonun, SOD ve hemosiyanin gibi bazı bakıra bağlı apoenzimlere de bakırı verdiğini, Cu^{+} 'i bağladığını ve Cu^{+2} 'yi indirgediğini göstermiştir. Glutasyon hücre içine bakır dağıtımı için doğrudan gerekmez, fakat bakırı bağlayıcı proteinlerin bakırı bağlama güçlerini onarmak için gerekli olabilir (Harris, 2003; Tapiero ve ark., 2003; Arredondo ve Nunez, 2005). Glutasyonun bir şaperon değil, hücrede bakır bağlayan bir protein olarak görev yaptığını bildiren çalışmalar da vardır (Mehta ve ark., 2006).

2.2.4.5 Metallothionein

Sisteinden zengin bir protein olan metallothionein, esansiyel olmayan ve aşırı miktardaki esansiyel metallerin detoksifikasyonunda, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin zararsız yapıda tutulmasında, çinko (Zn) ve bakırın hücre içi taşınmasında, bakırın hücre içi konsantrasyonunun korunması ve depolanmasında rol oynadığı bilinir (Harris, 2003; Ogra ve ark., 2006). Esas olarak karaciğerde üretilip depo edilir ve gerektiğinde kana verilir. Metallothionein'in biosentezini pek çok ağır metal iyonları (Cu, Zn, Cd, Hg), hormonlar, sitotoksik ve yangısal etkenler, oksidatif ajanlar ve stres durumları tetikler (Şekil 3) (Irato ve ark., 2001; West ve ark., 2008).

Bakteri, mantar, bitki ve memelilerden izole edilmiş değişik formları bulunur (Dameron ve Harrison, 1998). Metallothionein'in bilinen dört izoformu vardır (MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV). Metallothionein -I ve MT-II merkezi sinir sistemi dahil bir çok dokuda, MT-III (growth inhibitör faktör olarak da adlandırılır) özellikle merkezi sinir sisteminde, MT-IV ise keratinize epitel dokuda eksprese edilir (Klassen ve ark., 1999; Hidalgo ve ark., 2001; Formigari ve ark., 2007). Metallothionein'in plasentada bu dört izoformu da bulunur (Klaassen ve ark., 1999).

Metallothionein-I ve MT-II'in dokulardaki konsantrasyonları prenatal ve postnatal dönemlerde değişir. Doğumda karaciğer, böbrek, dalak, kalp, akciğer,

pankreas ve midede MT düzeyleri normale göre oldukça yüksektir. Doğumdan 3-4 hafta sonra yetişkin düzeylerine inerler. Beyinde ise prenatal dönemde MT konsantrasyonu normalin yarısı seviyesindedir. Ayrıca bu dönemde MT, daha çok çekirdekte eksprese edilir (Klaassen ve ark., 1999).

Metallotionein'in bakırın çok az bulunduğu ortamda SOD1'in aktivitesini devam ettirmesini sağlayabileceği ve bakır eksikliğinde hücreyi koruyabileceği ileri sürülür (Ogra ve ark., 2006). Aynı doğrultuda, MT hücre içi bakırı bağlayarak, serbest ve fazla bakıra bağlı oksidatif stresi inhibe eder ve sitokrom-c'nin salınması ile kaspaz-3'ün aktivasyonu üzerinden gelişen bakıra bağlı apoptozisi engeller (Kawai ve ark., 2000). Bakır zehirlenmesine karşı MT'in sentezini uyaran çinko, dolaylı olarak organizmayı korur (Kawai ve ark., 2000; Irato ve Albergoni, 2005).

2.2.5 Bakırın Hücreden Atılması

Bakırın hücre dışına taşınması ve yapısına girdiği enzimlere bağlanmasını sağlayan hücre içi bileşenler, Cu taşıyıcı P-tip ATPaz ailesinde bulunan ATP7A (Menkes proteini) ile ATP7B (Wilson proteini) genleridir ve bakır homeostazisinde önemli bir yere sahiptirler (Langner ve Denk, 2004; Arredondo ve Nunez, 2005; Linz ve Lutsenko, 2007; Nyasae ve ark., 2007). Bakır homeostazisinde merkez organ karaciğerdir. Bakır homeostazisi duodenumda Ctrl tarafından bakır absorpsiyonu ve karaciğerden bakırın safraya salınımı aşamasında gerçekleşmektedir (Kuo ve ark., 2006; Lutsenko ve ark., 2007).

2.2.5.1 P-tip ATPazlar: ATP7A ve ATP7B

ATP7A karaciğer dışındaki dokularda, ATP7B ise karaciğer ve daha az miktarda böbrek, plasenta, beyin, kalp ve akciğerde bulunur (La Fontaine ve Mercer, 2007; Linz ve Lutsenko, 2007). Her iki transport proteininin birlikte bulunduğu organlar olan meme bezi, plasenta ve purkinje hücrelerinde görev paylaşımı yaptıkları düşünülmektedir (Lutsenko ve ark., 2007). ATP7A ve ATP7B enzimatik karakterlerine göre özdeş değildirler (Barnes ve ark., 2005).

ATP7A ve ATP7B'nin hücre içi yerleşimleri hücre içi bakır konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Nyasae ve ark., 2007). Normal şartlarda her iki protein de Golgi ağında lokalize olur (Wijmenga ve Klomp, 2004; La Fontaine ve Mercer, 2007).

ATP7A karaciğer dışındaki dokularda bakıra bağlı enzimlere (tirozinaz, lizil oksidaz) bakırı sağlamakla görevlidir (Lutsenko ve ark., 2007). Karaciğer ve beyinde bulunan ATP7B bakırın seruloplazmine bağlanmasını sağlar. Ayrıca ATP7B hepatositlerde bakır konsantrasyonu yükseldiğinde bakırın veziküller içinde depolanmasında ya da karaciğerden safraya salınmasında görevlidir. ATP7A ve ATP7B sitosolden bakırı hücre dışına taşıırken enerji kullanır (Voskoboinik ve ark, 2001). Demir eksikliğinde bağırsakta ATP7A ekspresyonunun arttığı görülür. Bu durum bağırsakta bakırın taşınmasını artırır ve dolayısıyla bağırsak ve karaciğerde bakır birikmesine neden olmaktadır (Ravia ve ark., 2005)

ATP7A genindeki bozukluk, sistemik bakır eksikliği ile kendini gösteren ve çocukluk döneminde ölümle sonuçlanan Menkes hastalığına, ATP7B genindeki mutasyonlar ise özellikle karaciğer ve beyinde anormal bakır birikimi ile kendini gösteren Wilson hastalığına neden olur (Weiss ve ark., 2008).

Bakırı ayarlayan diğer bir faktör olan *Copper metabolism gen MURR1 domain containing 1* (COMMD1) proteini son zamanlarda keşfedilmiştir. Gen ismi MURR1'dir. Yapısında bakır bağlayan bölgeleri taşımayan ve Atox1 ile doğrudan bağlantısı olmayan MURR1 geni ATP7B'den safraya bakırın verilmesi için gereklidir. Bu genin yokluğunda karaciğerde anormal düzeyde bakır birikmektedir (Prohaska ve Gybina, 2004). Çoğunlukla Bedlington terrierlerinde görülen ve otozomal resessif bir hastalık olan köpeklerin bakır zehirlenmesinde, hepatositlerin lizozomunda bakır birikiminin nedeni MURR1 geninin yokluğudur (Prohaska ve Gybina, 2004; Ogra ve ark., 2006).

2.3. BAKIRIN ORGANİZMADAKİ GÖREVLERİ

Memeli organizmalarında bakır birçok enzimin yapısına girer ve birçoğunda kofaktörü olarak görev yapar (Tapiero ve ark., 2003). Bunlardan bazıları:

Sitokrom-c oksidaz: Mitokondride elektron taşınmasında görevlidir.

Cu/Zn SOD: Serbest radikallerin detoksifikasyonu sağlar.

Metallotionein: Fe^{+2} hariç diğer iki değerlikli metallerin depolanmasında görevlidir.

Seruloplazmin (hücre dışı): Kanda demir ve bakırı taşıyan proteinlerdendir aynı zamanda demir indirgeyicidir.

Protein-lizil-6-oksidaz: Yapısında bakır bulunan kollajen ve elastinin çapraz bağ oluşturmasını sağlayan enzimdir.

Tirozin (katekol oksidaz): Melanin sentezlenmesini sağlar.

Dopamin- β -monooksijenaz: Katekolaminlerin üretilmesinde görevlidir.

Diamin oksidaz: Histamin ve poliaminlerin inaktivasyonu (hücre içi ve hücre dışı) sağlar.

Amin oksidaz (hücre dışı): Histamin, tiramin, dopamin ve serotonin'in (?) inaktivasyonunda görevlidir.

Peptidilglisin monooksijenaz: Peptid hormonların aktive eder.

Hafaestin: Entrositlerin Golgi ağında lokalize olan, seruloplazmine benzer fonksiyona sahip bir ferrooksidazdır.

CMGP (Cartilage matrix glycoprotein): Kondrosit ve göz siliar epitelinde bulunan, seruloplazmine benzer fonksiyona sahip bir ferroksidaz-aminoksidazdır.

β -amiloid prekürsor protein: Normal fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

Hücreyel prion protein: ROS'a karşı koruyucu olduğu ileri sürülen yapısında bakır bulunan proteindir ve SOD'a benzer aktiviteye sahiptir.

Angiogenin: Kan damarı oluşumunu sağlar.

Kan pıhtılaşma faktörü V ve VIII: Kanı pıhtılaşmasında görev alır (Tapiero ve ark., 2003).

2.4. BAKIR ZEHİRLENMESİ

Normal bakır homeostazisinin bozulması veya metabolik ihtiyaçların üstünde bakır birikimi, bakır zehirlenmesine neden olur. Kalıtsal metabolik bozukluk nedeniyle oluşan bakır zehirlenmesi primer, aşırı bakır alımı ya da bakır atılımının azalmasından kaynaklanan zehirlenme ise sekonder bakır zehirlenmesi olarak sınıflandırılmaktadır (Fuentealba ve Aburto, 2003). Memeli hücreleri kendilerini bakır zehirlenmesinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Hücre, dışardan bakır alımını azaltarak veya hücre içindeki fazla bakırı ya P-tip ATPaz pompasıyla dışarı atarak ya da intrasellüler şelat oluşturarak zehirlenmeyi sınırlandırmaya çalışmaktadır (Dameron ve Harrison, 1998).

2.4.1 Primer Bakır Zehirlenmesi

Bakır depolamasındaki kalıtsal bozukluklar primer bakır zehirlenmesi olarak ifade edilir. İnsanlarda Wilson hastalığında görülen bu zehirlenmeye, Long Evans Cinnamon ratları (LEC), toksik milk mouse, Bedlington ve West Highland White Terrierleri gibi hayvanlar da duyarlılık göstermektedir (Fuentealba ve Aburto, 2003).

2.4.1.1 Wilson hastalığı

Otozomal resesif bir genin kodladığı Wilson hastalığı, öncelikle karaciğerde daha sonra sırasıyla böbrek, beyin, kornea ve meme bezinde bakır birikmesi ile karakterize yetişkinlere özgü bir hastalıktır. Karaciğerde bakır birikimi seruloplazmine veya safraya bakırın taşınmasındaki bir bozukluktan kaynaklanır (Strausak ve ark., 2001; Langner ve Denk, 2004). Wilson hastalığı, hücrede Golgi ağı ve endozomlarda lokalize olan bakır taşıyıcı P-tip ATPaz familyasına ait ATP7B genindeki bozukluk nedeni ile oluşur (Fuentealba ve Aburto, 2003; Langner ve Denk, 2004). Wilson hastalığı, yetişkinlerde nörolojik semptomlar oluştururken çocuklarda hafif karaciğer problemlerine neden olur (Waggoner ve ark., 1999; Harris, 2003; Langner ve Denk, 2004).

Hastalıkta histopatolojik olarak, beynin beyaz maddesinde demyelinasyon ve astrositik hiperplazi belirgindir (Strausak ve ark., 2001). Nörolojik Wilson hastalığı için spesifik olan yapı Kayser-Fleischer halkasıdır. Bu halka, korneanın desement membranında bakır ve sülfürden zengin granüllerin birikimiyle oluşan altın sarısı-kahve renkli bir yapıdır (Tapiero ve ark., 2003). Wilson hastalığı, karaciğerde periportal hepatositlerin çekirdeğinde glikojen birikimi, steatozisten siroza kadar ilerleyici bir özellik gösterir. Bazı hastalarda portal lenfositik hücre infiltrasyonu görülürken, bazılarında hepatositlerde balonumsu şişkinlik, Mallory cisimcikleri, hepatositlerde anizositozis ve çekirdeklerinde anizokülozis vardır. Portal ve periportal bölgelerdeki fibrozis genişleme eğilimindedir ve kısa zamanda siroza dönüşür (Langner ve Denk, 2004).

2.4.1.2 Wilson hastalığının hayvan modelleri

Bedlington terrierlerinde görülen bakır zehirlenmesi: Bedlington Terrierlerinin kalıtsal bakır zehirlenmesi Cu-ATPaz'ı olan ATP7B genindeki bozukluk nedeniyle safraya bakır atılımının azalmasından dolayı karaciğerde aşırı bakır birikimi ve sirozla sonuçlanan bir bozukluktur (Harris, 2003; Tapiero ve ark., 2003). Bakır zehirlenmesi sadece ATP7B genindeki bozukluktan değil, aynı zamanda köpeklerin 10. kromozomunda bulunan COMMD1 genindeki bozukluktan da kaynaklanmaktadır (Harris, 2003; Forman ve ark., 2005).

Klinik olarak; depresyon, anoreksi, letarji ve kusmanın görüldüğü Bedlington Terrierlerde mikroskopik olarak; başlangıçta karaciğerde periasiner hepatositlerde kahve renkli granüller şeklinde bakır birikimleri dikkati çeker. Daha sonra hepatosellüler dejenerasyon odakları, nekroz ve periportal bölgelerde nötrofil, lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonları görülür. Nörolojik hasar ile korneanın desement membranında bakır ve sülfürden zengin granüllerin birikimiyle karakterize altın sarısı-kahve renkli Kayser-Fleischer halkasının oluşmaması ve seruloplazmin düzeyinin değişmemesi bu hastalığı Wilson hastalığından ayırır (Fuentealba ve Aburto, 2003).

Benzer kalıtsal bakır depolama bozukluğuna West Highland White Terrierlerinde de rastlanır (Fuentealba ve Aburto, 2003; Jubb ve ark., 2007).

Toksik milk mouse: ATP7B genindeki bir defektin neden olduğu toksik milk mouse, karaciğerde şiddetli bakır birikimine ve yeni doğan yavrunun bakırdan mahrum kalmasına sebep olan bozukluktur. Yeni doğanlarda kısa sürede ölüm görülmesine rağmen kurtulanlarda karaciğerde nodüler fibrozis, safra duktuslarında hiperplazi ve portal bölgelerde lenfositik hücre infiltrasyonu dikkati çeker (Fuentealba ve Aburto, 2003; Harris, 2003; Langner ve Denk, 2004).

Long evans cinnamon ratlarında görülen bakır zehirlenmesi: Long Evans Cinnamon ratlarında oluşan bakır zehirlenmesi, seruloplazmin ile bakırın birleşme eksikliği ya da bakırın safra yoluyla atılımındaki bozukluktan kaynaklandığı düşünülür. LEC ratlarında klinik olarak sarılık görülür ve ölüm ile sonuçlanır (Harris, 2003). Histolojik olarak erken dönemlerde hepatosellüler karyomegali, çok sayıda Councilman cisimcikleri, masif nekroz, hepatositlerde mitoz ve apoptozis göze çarpar. Bu dönemi atlatan ratlarda kronik hepatitis, kolangiofibrozis, neoplastik nodüller ve hepatosellüler karsinom gelişir (Langner ve Denk, 2004).

2.4.1.3 Wilson hastalığı dışındaki bakır zehirlenmesi

İnsanlarda bebek ve çocukluk döneminde karaciğerde bakır birikimi nedeniyle oluşan hastalıklar, Hindistan çocukluk dönemi sirozu, idiopatik bakır zehirlenmesi ve endemik Tyrolean çocukluk dönemi sirozu bu grupta yer alan hastalıklardır. Kuzey Ronaldsay koyunlarında görülen bozukluklar Hindistan çocukluk dönemi sirozu ile büyük benzerlikler gösterir. Klinik ve patolojik olarak ayırt edilemeyen bu hastalıklar, hayatı tehdit eder ve belirgin perisellüler fibrozis, hepatositlerde balonumsu şişkinlik, Mallory cisimcikleri ve sirozla karakterizedir. Bahsedilen iki hastalığın etiyolojisini, ekzojen bakır ve genetik predispozisyon oluşturur (Harris, 2003; Simpson ve ark., 2006).

Kuzey Ronaldsay koyunlarının bakır zehirlenmesi: Kuzey Ronaldsay adasına özgü olan bu koyun ırkı bakırdan yoksun gıda ile özellikle su yosunlarıyla beslenir. Bakıra çok duyarlı olan bu koyunlar diğer koyun ırklarından daha fazla bakırı absorbe etme özelliğine sahiptirler. Kuzey Ronaldsay koyunlarının bakır zehirlenmesi, patomorfolojik olarak diğer koyunların bakır zehirlenmesinden farklı olup, yeni doğanların hepatik bakır zehirlenmesinin benzeridir. Mikroskopik olarak panlobüler perisellüler fibrozisten aktif hepatitise ve siroza kadar değişen lezyonlar dikkati çeker (Fuentealba ve Aburto, 2003; Harris, 2003; Langner ve Denk, 2004; Simpson ve ark., 2006).

2.4.1.4 Bazı türlerde bakır birikimine eşlik eden primer bilier siroz

Primer bilier siroz, kronik ve progresif seyirli, öldürücü bir sirozdur. Nedeni tam olarak bilinmeyen bu hastalığın immun nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu hastalıkta görülen bakır birikimi hiçbir zaman kalıtsal bakır depo hastalıklarındaki düzeylere ulaşmaz (Fuentealba ve Aburto, 2003).

Doberman pinscher'ların kronik hepatitisi: Daha çok orta yaşlı ve kısırlaştırılmış dişi Doberman pinscher'larda görülen kronik aktif hepatitis, kolestazis ve sirozla karakterize bir hastalıktır. Hastalığın sebepleri tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen bakır birikiminin sentroasiner bölgede olması hastalığın immun nedenli olabileceğini akla getirmektedir (Fuentealba ve Aburto, 2003).

Skye terrier hepatitisi: Skye terrier hepatitisi, hepatosellüler dejenerasyon, intrakanaliküler kolestazis ve periasiner bakır birikimiyle karakterize bir hastalıktır. Bu hastalık çoğunlukla sirozla sonuçlanır. Sebebi tam olarak bilinmeyen Skye terrier hepatitisi periasiner bölgedeki hepatositlerde membran aktarım ve taşıma sistemindeki bozuluktan kaynaklanabilir (Fuentealba ve Aburto, 2003).

Feline kolangiohepatitis kompleksi: Etiyoloji ve patogenezi tam olarak anlaşılmamış olan bu hastalık, kedilerin non-supuratif kolangiohepatitisidir. Mikroskobik olarak, portal bölgede lenfositik ve plazmasitik infiltrasyon, portal hepatositlerde bakır granülleri, safra duktus hiperplazisi ve portal bölgede fibrozis ile karakterizedir (Fuentealba ve Aburto, 2003).

2.4.2 Sekonder Bakır Zehirlenmesi

Veteriner hekimlikte antelmantik olarak, tarımda ise meyve ağaçlarındaki paraziter mantarlara karşı kullanılan bakır sülfat, sekonder bakır zehirlenmesinin en önemli kaynağıdır. Bakır sülfatla kirlenmiş su ve bitkilerin hayvanlar tarafından yenmesi bakır zehirlenmesine yol açar. Diyetteki bakır emilimini engelleyen ya da azaltan bazı mineral ve bileşiklerin eksikliği de bakır zehirlenmesine neden olur. Molibden ve sülfattan yetersiz, bakırı fazla hazırlanan rasyonla beslenen hayvanlarda bakır zehirlenmesi görülür. Diğer taraftan bakır birikimine neden olan *Heliotropium europoeum* gibi pirolizidin alkaloidleri, *Trifolium subterraneum* ve yeraltı yoncası da kronik bakır zehirlenmesine neden olur (Kaya ve ark., 2002; Jubb ve ark., 2007).

Akut bakır zehirlenmesi yüksek dozda eriyebilir bakır tuzlarının alınmasıyla, kronik zehirlenme ise bakırdan zengin topraklarda yaşayan hayvanlarda uzun süre az miktarda bakır tuzlarının alınmasıyla oluşur. Kronik zehirlenmede kümülatif bir birikim söz konusudur ve bir süre sonra akut hastalık tablosu ortaya çıkar. Bakır zehirlenmesinin mekanizması, oksidatif hasarın neden olduğu hepatosit membranındaki lipid peroksidasyonu ve eritrositlerde hemoglobin denaturasyonudur (Sullivan ve ark., 1991). Koyunlar erişkin sığır ve domuzlardan daha duyarlıdır (Jones ve ark., 1997; Hazıroğlu ve Milli, 2000; Kaya ve ark., 2002; Fuentealba ve Aburto, 2003; Jubb ve ark., 2007).

Akut zehirlenmede; abdominal sancı, şiddetli ishal ve kusma görülür. Dışkı ve kusmukta mukus vardır ve karakteristik olarak yeşil-mavi renktedir. Vücut ısısı düşer,

kalp atımı hızlanır ve şiddetli şok tablosuyla birlikte kollaps ve ölüm oluşur. Histopatolojik olarak; koyunlarda erozyon ve ülserlerle karakterize hemorajik ödematöz abomazitis oluşur (Jones ve ark., 1997; Hazıroğlu ve Milli, 2000; Jubb ve ark., 2007).

Kronik zehirlenmede; gevişgetirenlerde iştahsızlık, susuzluk, hemoglobinüri ve ikterus şekillenir. Kısa sürede hayvanlar ölür (Sullivan ve ark., 1991; Hazıroğlu ve Milli, 2000). Damar içi hemoliz varsa, kronik zehirlenmenin karakteristik bulguları oluşur. Karaciğer büyür, gevrek kıvamdadır ve sarımsı-kahve renk alır. Safra koyu renkte ve granüler yapıdadır. Dalak büyür, yumuşak kıvamda ve koyu renktedir. Böbrekler şişkin ve koyu renkli olup, idrar hemoglobiniye bağlı olarak koyu kırmızı renk alır (Jones ve ark., 1997; Jubb ve ark., 2007).

Bakır, hepatositlerin lizozomlarında biriktiği için lizozomların membran bütünlüğü bozulur. Bakır ve hidrolazlar hücrede yıkıma yol açar ve karaciğerde apoptozis artar. Hepatositler şişkindir ve çekirdekleri veziküler bir hal alır. Mitoz oranı artar. Sinuzoidler ve damar çevresindeki stromada makrofajlarda artış vardır. Bu hücrelerde lipofuksin yapısında eozinofilik, granüler artıklar bulunur. Ölen hücrelerden serbest kalan bakır yüksek mitoz etkinliği ile oluşan yeni hepatositlerce alınır. Hepatositlerdeki kayıp oranı yenilenme oranını aşarsa plazmada bakır düzeyi yükselir. Karaciğerdeki depolardan fazla miktarda bakırın kana salınması sonucu eritrositlerin yıkımına bağlı olarak akut intravasküler hemoliz oluşur. Hemoliz hepatositlerde nekroz şekillenmesini artırır, böylece dolaşıma daha fazla bakır girer. Hemoliz atağı 2-6 gün sürer ve Heinz cisimciği oluşumu, hemoglobinemi ve hemoglobiniye ile sonuçlanır. Bakırın taşıyıcı protein kapasitesinden fazla miktarda plazmaya aniden verilmesi, eritrositlerin antioksidan sistemini bitirir ve globin denaturasyonu şekillenerek Heinz cisimciği oluşur. Hematolojik olarak; hemotokrit %60 veya daha fazla oranda aniden artar. Hemoliz süresince belirgin anizositozis, polikromazili poikilositoz ile Howell-Jolly cisimcikleri ve rubisitlere rastlanır. Eğer ölüm olmazsa retikülositozis iyileşmenin başladığını gösterir. Hemoglobiniye bağlı olarak hemoglobin proksimal tubul epitellerinde birikerek böbrekte hemoglobiniyik nefrozise neden olur (Sullivan ve ark., 1991; Jones ve ark., 1997; Hazıroğlu ve Milli, 2000; Aburto ve ark., 2001; Fuentealba ve Aburto, 2003; Jubb ve ark., 2007).

Sekonder bakır zehirlenmesi; fitojen ve hepatojen kronik bakır zehirlenmesi şeklinde iki formda görülür. Fitojen zehirlenmede bakır alımı normaldir ancak bazı

bitkilere bağılı olarak bakır retensiyonu oluşur. Fitojen zehirlenmeye özellikle tırfıl (*T. subterraneum*) bulunan meralarda otlayan koyunlarda rastlanmıştır. Kronik bakır zehirlenmesinde olduğu gibi hemolize rastlanır. Ciddi bakır birikimine neden olan *H. europoeum* gibi hepatotoksik etkili pirolizidin alkaloidlerini içeren bitkilerin bulunduğu meralarda 2-5 ay otlayan hayvanlarda hepatojen bakır zehirlenmesi oluşur. Yeni doğanlar pirolizidin alkaloidlerine daha fazla duyarlıdırlar. Kontamine meralarda otlayan ineklerin sütleriyle yavruya geçen pirolizidin alkaloidleri yeni doğanlarda siroza ve bakır birikimine yol açar (Aston ve ark., 1998; Hazıroğlu ve Milli, 2000).

Etkilenen hayvanlarda gelişim geriliği, ileri derecede zayıflama, asites, hafif sarılık ve sinirsel bulgulara rastlanır. Makroskobik olarak; karaciğer fibrotik ve solgundur, ileri dönemlerde ince nodüler görünüm alır. Mikroskobik olarak; en karakteristik bulgu hepatositlerin çoğunda çok sayıda sarı-esmer renkte granülün ve Kupffer hücrelerinde koyu renkte pigmentlerin bulunmasıdır. Karaciğerde kronik hepatitis şekillenir; periportal aralıklarda hafif yangısal hücre topluluklarına ve belirgin nekroz odaklarına rastlanır. Fibrozis portal ya da diffuz tipte olup, hepatositler genelde yağ kapsar (Jones ve ark., 1997; Hazıroğlu ve Milli, 2000; Jubb ve ark., 2007).

2.5. BAKIR ZEHİRLENMESİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Bakır zehirlenmesinin moleküler mekanizmasını açıklayan birkaç teori vardır. Bunlardan biri, bakırın lizozom membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak hidrolitik enzimlerin salınması sonucu sitotoksik etki oluşturmaktadır (Lindquist 1968; Gooneratne ve ark. 1980). Pourahmat ve ark, (2001) bu teoride bakırın sitotoksik etkisinin hücrelerde lipid, nükleik asit ve proteinlere hasar veren ROS'nin oluşmasına neden olmasından kaynaklandığını bildirmektedir. İkinci teori; bakırın önce hepatositlerin lizozomunda, ilerleyen dönemlerde hepatositlerin çekirdeğinde birikerek lizozom fragilitasını arttırması, ayrıca çekirdek yapısını bozmasıdır. Bakır, hepatositlerdeki lizozomlar yırtılmasa bile çekirdeği hasara uğrattır (Haywood ve ark., 1985; Fuentealba ve Haywood, 1988; Fuentealba ve ark., 1989). Diğer bir teori ise; bakırın hücredeki mitokondri membranını hedef olarak seçmesi ve trikarboksilik asit siklusundaki enzimler ile enerji metabolizmasını bozarak hücreyi zehirlenmeye götürmesidir (Saris ve Skulski, 1991; Arciello ve ark., 2005; Sheline ve Choi, 2004).

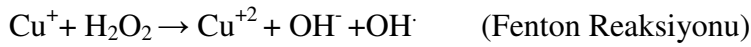
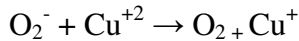
Canlıların bakıra olan duyarlılığındaki farklılığın moleküler temeli tam olarak

anlaşılamamıştır. Bu, bakırın absorpsiyon oranı, taşınması, safrayla atılması, hepatositlerde bakırın depolanması ve kimyasal reaktivitesi gibi etkenlere bağlı olabilir (Stohs ve Bagchi, 1995; Ke ve ark., 2008). Memeli hücreleri bakır zehirlenmesinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar başlıca, hücrenin dışarıdan bakır alımını azaltması ya da hücre içindeki fazla bakırı P-tip ATPaz pompalarıyla dışarı atmasıdır. Ayrıca hücreler intrasellüler fazla bakırı sülfidlerle birleştirerek şelatlar oluşturmak suretiyle, bakırı organeller içinde depolayarak ya da MT'e bağlayarak zehirlenmeyi önlemeye çalışırlar (Dameron ve Harrison, 1998). Hücre içinde fazla miktarda bakır biriktiğinde, intrasellüler antioksidanların azaldığı ve aktivitelerinin inhibe edildiği, ROS'nin [süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO)] daha fazla üretildiği bildirilmektedir (Formigari ve ark., 2007).

2.5.1 Bakır Zehirlenmesinin Neden Olduğu Reaktif Oksijen Türleri ve Koruyucu Mekanizmalar

2.5.1.1 Bakır zehirlenmesinin neden olduğu reaktif oksijen türleri

Serbest bakır iyonları ROS oluşmasına neden olan oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına katılır. Cu^{+2} süperoksit radikali veya askorbik asit gibi indirgeyici ajanların varlığında Cu^{+} 'e indirgenir. Bakırın indirgenme reaksiyonları olan Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları H_2O_2 , $OH^\cdot$ oluşmasını katalize eder (Lloyd ve ark., 1997; Bremner, 1998; Valko ve ark., 2005).



$OH^\cdot$ bilinen en güçlü oksidan radikalidir ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir. Serbest yağ asitleri ve özellikle tiyollerle reaksiyona girerek yeni radikallerin oluşmasına neden olur. Oluşan ROS, hücre membranı ve organellerinin yapısında bulunan lipid, protein ve nükleik asitlerin hasarına ve kalsiyum (Ca) homeostasisinin bozulmasına neden olur (Stohs ve Bagchi, 1995; Bremner, 1998; Gaetke ve Chow, 2003; Valko ve ark., 2005; Rana, 2008).

2.5.1.2 Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz yapısında metal bulunan antioksidan özelliğe sahip bir enzimdir. ROS'nin detoksifikasyonunda çok önemli yere sahiptir. SOD, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Memelilerde bilinen üç izomeri vardır. SOD1 sitoplazmada bol bulunur ve prostetik grup olarak Cu-Zn içerir. İkinci izomeri olan SOD2 mitokondride bulunur ve prostetik grup olarak Mn taşır. Üçüncü izomeri ise SOD3'tür, hücre dışında bulunur ve hücre yüzeyine tutunabilir. SOD3'ün heparan sülfata olan affinitelerine göre değişen üç formu vardır (Johnson ve Giulivi, 2005). SOD1 geninde oluşan mutasyonlar insanda ailesel amiyotropik lateral skleroz olarak adlandırılan motor neuronlarda neurodejenerasyona bağlı olarak kas atrofisi ve ilerleyici paraliz ile seyreden hastalığa neden olur (Johnson ve Giulivi, 2005; Mehta ve ark., 2006).

2.5.2 Bakır Zehirlenmesine Bağlı Hücre Ölüm Şekilleri

Metal zehirlenmesinde bildirilen iki hücre ölüm şekli vardır. Bunlar nekroz ve apoptozistir.

2.5.2.1 Nekroz

Nekrozda ani ve şiddetli bir hücre hasarı söz konusudur. İskemi, fiziksel ve kimyasal travmalar ve enfeksiyon etkenleri sonucunda şekillenebilir. Hücredeki denge aniden bozulur, sitoplazma, organeller ve en önemlisi hücre membranı hasar görür. Mitokondri fonksiyonları bozularak enerji üretemez, hücre membranı osmotik basıncı ayarlayamadığı için ekstrasellüler sıvı hücre içine girer (Kumar ve ark, 1995). Nekroza giden hücrenin sitoplazması şişer, mitokondride vakuolizasyon, nüklear piknozis ve hücre zarının bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte hücre içeriği ve lizozomal enzimler etrafa yayılır. Sonuçta hücre lize olur ve etrafında yangı başlar. Nekroz gruplar halinde hücreleri etkiler (Kumar ve ark., 1995; Erer ve ark., 2000; Sabolic, 2006; Aydın, 2008). Fazla bakırın hepatositlerin lizozomlarında ve ilerleyen dönemlerde çekirdeğinde birikerek ya lizozomların yırtılması sonucu enzimler ile ve/veya çekirdeğin parçalanması sonucu hücrenin nekrozuna neden olduğu bildirilmektedir (Fuentealba ve Haywood, 1988).

2.5.2.2 Apoptozis

Organizmanın bütünlüğü ve homeostazisi, hücre çoğalması ve farklılaşması yanında hücre ölümü ile sağlanır. Yüksek organizmalarda hücreler kendilerini yok edecek genetik bir düzeneğe sahiptirler. Yaşlı, hasar görmüş ya da anormal bir hücre apoptozis olarak adlandırılan yangısal olmayan ve enerji gerektiren bir yolla ölüme gider. Başlangıçta büzüşme nekrozu olarak bilinen apoptozis terimi ilk kez Kerr ve ark. (1972) tarafından Yunanca sonbaharda ağaçlardan ve çiçeklerden yaprakların dökülmesi anlamına gelen “apo-ptosis” kelimelerinden türetilmiştir. Apoptozis fizyolojik ya da patolojik koşullarda gözlenen, başladıktan sonra hızlı gelişen ve genler tarafından düzenlenen, morfolojik değişikliklere dayanan biyolojik bir fenomendir (Kerr ve ark., 1972).

Programlı hücre ölümü fizyolojik olarak şekillendiği kadar bazı viral enfeksiyonlar, iskemik kalp hastalıkları yanında, ROS, bazı metaller (Cu, Fe, Hg, Cd), hiperglisemi, iyonize radyasyon, pestisitler (DDT, endosülfan vb), bazı ilaçlar (Cisplatin, AktinomisinD vb) gibi nedenlerle de patolojik olarak oluşmaktadır (Solary ve ark., 1996; Anderson ve ark., 1999; Kanan ve Jain, 2000; Elmore, 2007).

Apoptozisdeki morfolojik değişiklikler: Apoptozis’e uğrayan hücreler RNA ve protein sentezini durdurur ve komşu hücrelerle bağlarını keser. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar kaybolur ve diğer hücrelerle yaptıkları bağlantılar ortadan kalkar. Apoptotik hücre çevresindeki diğer hücrelere göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Hücre zarı bütünlüğünü koruduğu için yangısal reaksiyon oluşturmaz. Apoptozise uğrayan hücrenin çekirdeği büzülür, kromatini yoğunlaşır ve genomik DNA’sı partiküller halinde parçalara ayrılır. Bu hücrelerin hücre membranı kabarcıklı, sitoplazması vakuollü bir görünüm alır. Küçük sitoplazmik vakuoller içinde çekirdek parçacıklarının bulunduğu apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik hücrelerin yüzeyinde bulunan fosfatidilserin makrofajlarca tanınmasını kolaylaştırır (Kerr ve ark., 1972; Fadok ve ark., 1992; Kumar ve ark., 1995). Apoptotik cisimlerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilmeleri sırasında proteolitik enzim veya toksik süperoksitler salınmadığı için yangıya neden olmaz. Bu sayede etraftaki hücreler hasar görmezler (Kerr ve ark., 1972; Anderson ve ark., 1999; Sabolic, 2006).

Apoptozisin genetik kontrolü: (*Ced-3 geni*): Ellis ve Horvitz, (1986) *Ceanorhabditis elegans* isimli şeffaf solucanda yaptıkları çalışmalarda programlı hücre

ölümünün *ced* (*Ceanorhabditis elegans* death) olarak adlandırılan genler ile kontrol edildiğini bulmuşlardır. *Ced-3* geni'nin memelilerdeki homoloğu kaspazlar (caspase) olup bunlar sistein proteazlarıdır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar (Metzstein ve ark., 1998). Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve uyarı aldıklarında birbirlerini aktifleştirirler. Memelilerde şu an bilinen 14 kaspaz vardır (Mirkes, 2002).

Kaspazlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılabilir. Grup 1 kaspazlar, kaspaz -1,-4,-5,-11,-12,-13,-14'dür. Bunlar apoptozisde değil proinflamatuvar sitokinlerin yönlendirilmesinde görev alırlar. Grup 2 kaspazlar, kaspaz -2, -8, -9, -10 olup apoptozisin başlamasında rol alarak kaspazları düzenlerler. Grup 3 kaspazlar, kaspaz -3,-6,-7'dir ve efektör kaspaz olarak bilinirler. Bunlar ise sellüler proteinlerin enzimatik olarak parçalanmasında anahtar rol oynayarak hücrenin ölmesini sağlarlar (Cohen,1997; Mirkes, 2002). Grup 2 ve 3'teki kaspazlar tüm hücrelerde inaktif proenzimler olarak bulunur. Apoptotik bir uyarı, hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olmakta ve/veya cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Bu da cascade (şelale) olarak isimlendirilen ve tam olarak açıklanamayan pek çok basamağı aktive etmektedir. Örneğin; sitoplazmik Ca^{+2} miktarında hafif artış c-fas, c-myc ve ısı şok proteini gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirir. Ayrıca, apoptoziste etkili endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimleri de aktive eder. Bu enzimler, kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde bozulmalara neden olur (Mirkes, 2002).

Apoptozis mekanizmaları: Apoptozisi başlatan üç temel uyarı mekanizması belirlenmiştir (Vermeulen ve ark., 2005).

- a. İç uyarılar ile (mitokondri bağlı) apoptozis mekanizması
- b. Dış uyarılar ile (reseptöre bağlı) apoptozis mekanizması
- c. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis mekanizması

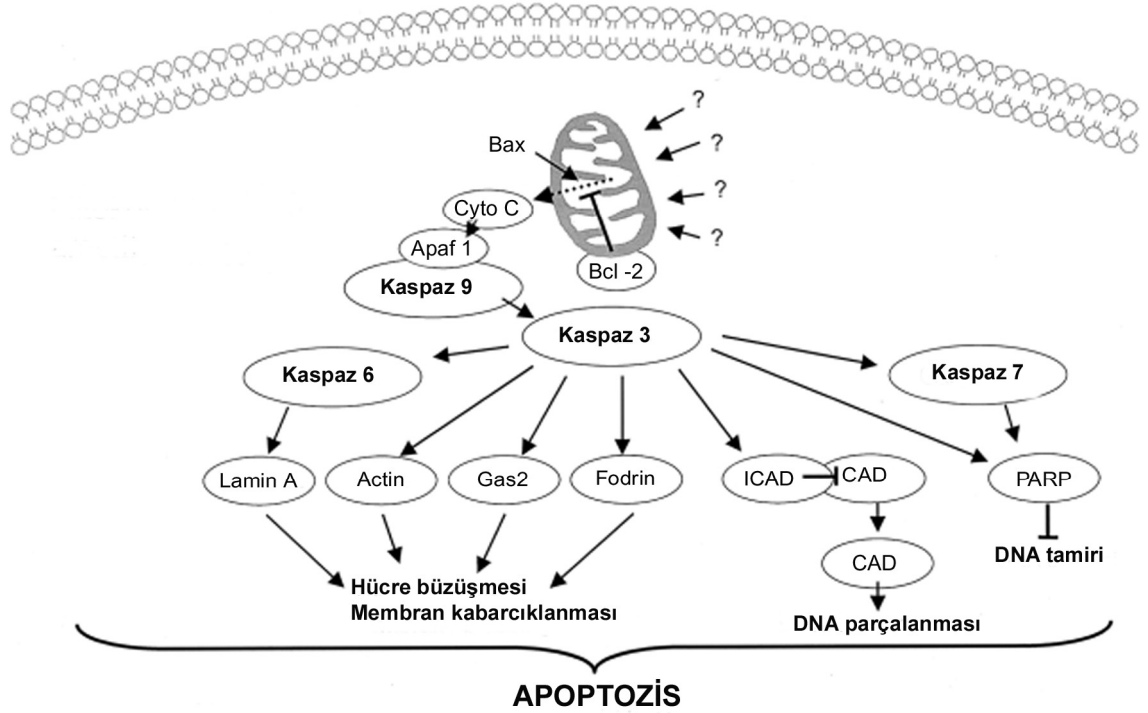
a. İç uyarılar ile (mitokondri bağlı) apoptozis mekanizması

Mitokondri, apoptozisi başlatan yolların kesiştiği organelidir. Mitokondri normal şartlarda ATP üretmek için sitokrom-c ihtiva eder. Sitokrom-c'nin salınım mekanizması konusundaki bilgiler henüz kesin değildir. Mitokondri membranında porlar (PTP: permeability transition pore) vardır. PTP, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonlar, protonlar, ADP/ATP konsantrasyonu, mitokondrial membran potansiyeli ve Bcl-2 proteinlerinin yapı ve fonksiyonlarında oluşan değişikliklerden etkilenir. Ölüm uyarısı Bcl-2'ye ulaştığında mitokondri iç ve dış zarlarında permeabilitenin artmasına, böylece sitokrom-

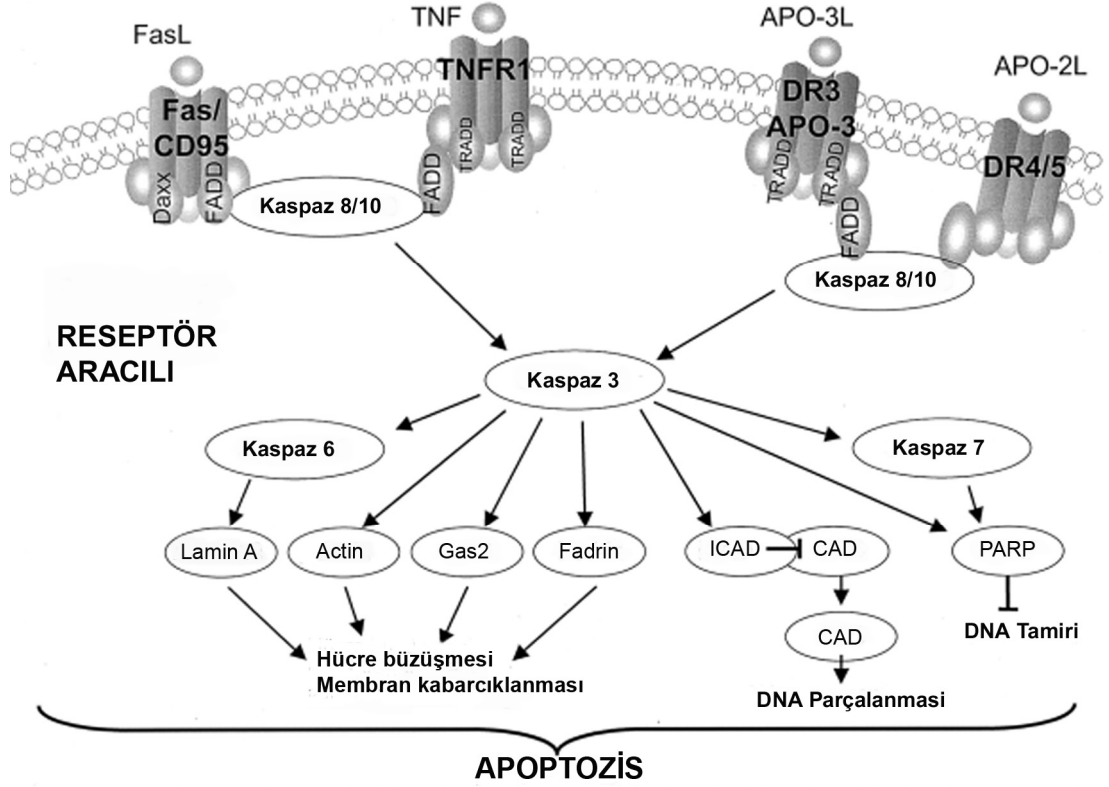
c'nin sitosole salınmasına neden olur. Sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor1) ve prokaspaz-9 birleşerek apoptozom kompleksini oluştururlar. Aktif kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz şelalesinin tetiklenmesini sağlar (Şekil 4) (Kanan ve Jain, 2000; Mirkes, 2002; Vermeulen ve ark., 2005; Chipuk ve Green, 2008).

b. Dış uyaranlar ile (reseptöre bağlı) apoptosis mekanizması

Hücre membranında dış apoptozis uyaranlarını alan TNF (Tumour receptor superfamily) ailesine ait reseptörler bulunur. Bu ailede Fas (Apo-1 veya CD95), TNF-R1, DR 3-6 (death reseptör 3-6) reseptörleri bulunur. Fas'ın Fas ligand (FasL) ile, TNF-R1'in TNF- α ile bağlanması sonucunda kaspaz-8'i aktive eden uyaranlar sitoplazmaya geçer. Reseptörlerin sitoplazmik bölümlerinde bulunan ölüm bölgeleri FADD (Fas-associated death domain protein) doğrudan, TRADD (TNF-associated death domain protein) ise FADD ile etkileşime girerek prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüşmesini sağlar (Mirkes, 2002; Vemeulen ve ark., 2005).



Şekil 4: İç uyaranlar ile (mitokondri aracılı) apoptosis mekanizması (Mirkes, 2002'den alınmıştır)



Şekil 5: Dış uyarılar ile (reseptör aracılı) apoptosis mekanizması (Mirkes, 2002'den alınmıştır)

Aktif kaspaz-8 ise pro-apoptotik Bcl-2 ailesinden Bid ile etkileşime girerek mitokondri zar permeabilitesini bozup sitokrom- c'nin sitosole salınmasını sağlar ve kaspaz şelalesinin aktive olmasına neden olur (Şekil 5) (Li ve ark., 1998).

c. Endoplazmik retikulum aracılı apoptosis mekanizması

Endoplazmik retikulum (ER), Ca^{+2} depolayan, hücre içi Ca^{+2} dengesini sağlayan ve protein sentezini düzenleyen kritik öneme sahip bir organeldir. ER'un membranında apoptotik proteinler olan kaspaz-12 ve Bap31 ile Ca^{+2} 'u düzenlemekle görevli olan kalneksin ve kalretikulin şaperonları vardır. Endoplazmik retikulum üzerinde lokalize olan kaspaz-12, ER'da Ca homeostazisinin bozulması ve fazla miktarda protein birikmesi ER stresinin oluşmasına ve sonuçta hücrenin apoptozisine neden olur (Nakagawa ve ark., 2000; Groenendyk ve Michalak, 2005).

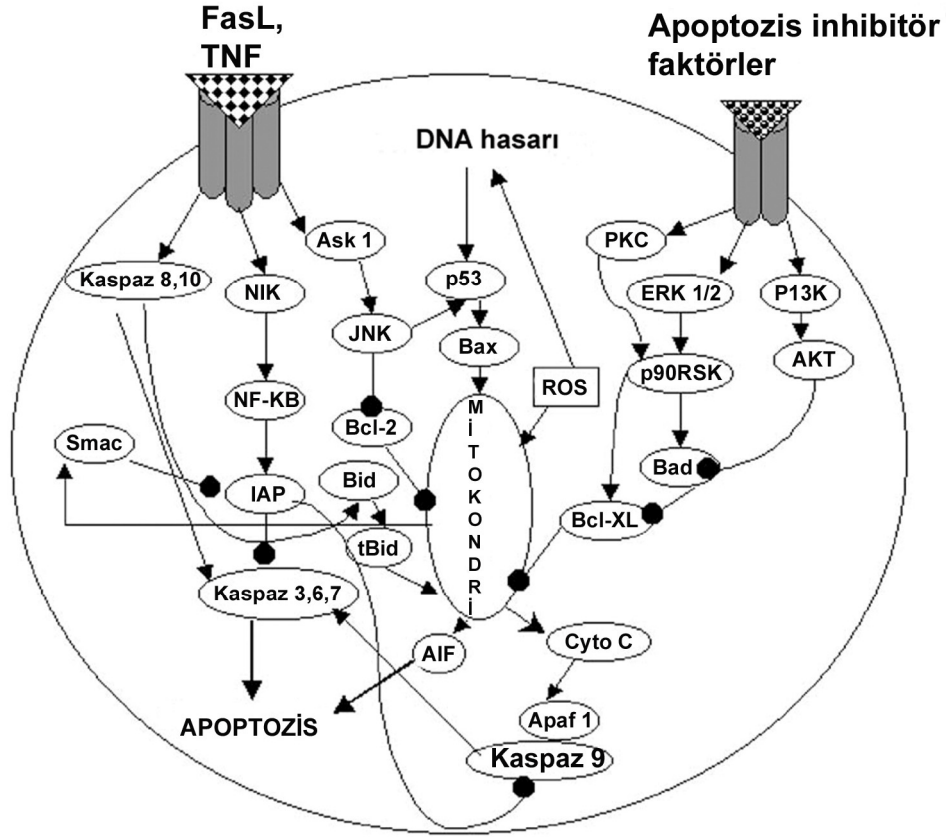
2.5.3 Bakır Zehirlenmesi ve Apoptozis

Hücrede serbest oksijen radikallerinin mitokondri, mikrozom, peroksisom ve lizozomlar tarafından üretildiği bilinmektedir (Richter ve ark., 1995; Anderson ve ark., 1999; Pourahmad ve ark., 2001; Pourahmad ve ark., 2003). Fazla bakır serbest oksijen radikallerinin üretimini tetikleyerek oksidatif strese neden olur (Rossi ve ark., 2004; Formigari ve ark., 2007). Serbest radikallerin hücredeki en önemli kaynağı olan mitokondri aynı zamanda serbest radikallerin ilk hedefidir (Pourahmad ve ark., 2003). Serbest radikaller mitokondrial membranda lipid peroksidasyonuna neden olurlar (Sokol ve ark., 1990; Saris ve Skulski, 1991; Richter ve ark., 1995; Siraki ve ark., 2002). Mitokondri membran geçirgenliği bozulup matriksteki eriyebilir bileşiklerin ve Ca^{+2} 'un dışarı salınması osmotik basıncın artarak mitokondrinin su alıp şişmesine, sitokrom-c'nin sitosole salınmasına ve kaspaz-9'un aktive olmasına neden olur (Şekil 6) (Kannan ve Jain, 2000; Simon, 2000).

Bakır zehirlenmesinde hepatositlerde fazla miktarda oluşan ROS'un $TNF\alpha$ 'yı indükleyerek kaspas-3'ü aktive ettiğini ve bu mekanizma üzerinden sitotoksik etki gösterdiği bildirilir (Pulido ve Parrish, 2003; Fong ve ark., 2004).

Fazla miktardaki bakır, asit sfingomyelinazı (Asm) aktive ederek seramid oluşumuna neden olur. Seramid iyi tanınan apoptotik uyaranlardan biridir. Bakır zehirlenmesinde aktive olan Asm'ın hepatosit ve eritrositleri apoptozise uğrattığı bildirilmektedir (Brewer, 2007).

İnsanlarda ATP7B genindeki mutasyonlar sonucu oluşan Wilson hastalığında, bakırın taşınmasındaki bozukluk nedeniyle karaciğerde bakır birikimi ve nöronal dejenerasyon görülür. Sinir sisteminde bakırın yol açtığı apoptozis nöron hasarının belirlenmesinde önemli bir kriterdir. Nöronal apoptozisin p53 geninin nüklear translokasyon ve indüksiyonuna bağlı olduğu bildirilir (Vanlandingham ve ark., 2005). Bakırın, p53 geninin transkripsiyonel aktivitesi üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılan *in vitro* bir çalışmada, bakırın indüklediği oksidatif stresin transkripsiyonel özellikleri değişmiş mutant p53'lerin sentezlenmesine neden olduğunu ve bakır aracılı apoptoziste rol oynayabileceği gösterilmiştir (Tassanbehji ve ark., 2005).



Şekil 6: ROS nedeniyle oluşan apoptozis. (→) apoptozisin aktivasyonu, (•) apoptozisin inhibisyonu (Pulido ve Parrish, 2003'den alınmıştır).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinden sağlanan, 56 adet erkek, erişkin, Sprague-Dawley ırkı rat (ortalama ağırlıkları 280 ± 50 g) kullanıldı. Bunlardan 28 adedi deneme, 28 adedi kontrol olarak tutuldu. Çalışmada kullanılan deney hayvanları için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulundan gereken izinler alındı (HEK 11). Denemeler başlamadan önce tüm ratların beden ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Deney süresince ratlar *ad libitum* olarak normal rat yemiyle beslendi ve tükettikleri yem miktarları kaydedildi.

3.2. BAKIR SÜLFAT SOLÜSYONUNUN HAZIRLANMASI

Ratlarda zehirlenme bakır sülfat (CuSO_4) (SIGMA Lot 69H0127) ile yapıldı. FAO/WHO (FAO Nutrition Meeting Report Series No. 48A WHO/FOOD ADD/70.39)'nun oral yolla verilen CuSO_4 için belirttiği LD_{50} değeri 300 mg/kg'dır (Anonim, 1970). Distile su ile 30 mg/ml dozunda hazırlanan CuSO_4 solüsyonu deneme grubundaki ratlara günlük 75 mg/kg olacak şekilde hesaplanarak verildi.

3.3. DENEYSEL ZEHİRLENMENİN OLUŞTURULMASI

Çalışmanın başlangıcından itibaren 1 hafta aralıklarla ratların ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Ratların beden ağırlıklarındaki değişimler dikkate alınarak, verilecek CuSO_4 solüsyonu yeniden hesaplandı. Belirlenen miktarlardaki CuSO_4 solüsyonu deneme gruplarındaki ratlara gastrik sonda yardımıyla verildi. Kontrol gruplarındaki ratlara ise deneme gruplarında olduğu gibi ağırlıklarına göre hesaplanan distile su günlük olarak gastrik sonda ile verildi.

3.4. DENEME PLANI

Çalışmada; iki deneme [I. deneme grubu (n=14) ve II. deneme grubu (n=14)] grubu ve deneme grupları için ayrı ayrı olmak üzere iki kontrol grubu [I. kontrol grubu (n=14), II. kontrol grubu (n=14)] oluşturuldu. Uygulama, I. deneme grubu ve I. kontrol grubuna 14 gün, II. deneme grubu ve II. kontrol grubuna 28 gün süreyle yapıldı (Tablo 1). Bu sürenin sonunda eter anestezisi altında ratların kalplerinden kanları alındıktan

sonra nekropsileri yapıldı.

Tablo 1. Deneme planı

Gruplar	Denek sayısı (n)	Uygulanan madde	Doz (mg/kg)	Uygulama süresi (gün)
I. Deneme Grubu	14	CuSO ₄	75 mg/kg	14
I. Kontrol Grubu	14	Distile su	400 g ağırlığındaki bir rata 1 ml distile su hesabıyla	14
II. Deneme Grubu	14	CuSO ₄	75 mg/kg	28
II. Kontrol Grubu	14	Distile su	400 g ağırlığındaki bir rata 1 ml distile su hesabıyla	28

3.5. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME İÇİN DOKU KESİTLERİNİN HAZIRLANMASI

Deneme süresi sonunda sistemik nekropsileri yapılan ratlardan karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, kalp, mide-bağırsak, beyin ve beyincik örnekleri alındı. Örnekler %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilip, 24 saat sonra trimlendi ve postfiksasyonları yapıldı. Doku örnekleri bir gün boyunca akarsu altında yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Mikrotom (Leica RM2125RT) ile 3-5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin histopatolojik muayene için hematoksilen-eozin (HE) ile boyandı. Alınan tüm doku kesitlerine Rodanin boyası (Anonim, 2009), seçilen bazı doku kesitlerine Periodik asit-Schiff (PAS) ve Toluidin blue boyama metotları uygulandı (Luna, 1968). Sonuçların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve Nikon DS Camera Head DS-5M ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

3.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL TEKNİĞİNİN UYGULANMASI

Hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlere Tablo 2'de isimleri verilen proteinlerin varlığını belirlemek için StreptAvidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği (SABK) uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH

7.4) ile sulandırıldı (Tablo 2). İmmunohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanıldı. Buna göre kesitler, aseton- 3- etoksipropilamin (100 ml aseton- 2 ml 3- etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58°C'lik etüvde kurutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 watta 20 dakika kaynatıldı ya da %1'lik proteinaz K (Sigma) ile 37°C'de 20 dakika tutuldu. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikorlar ile Tablo 2'de belirtilen sulandırma oranları ve sürelerde inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Değerlendirme sitoplazması ve/ veya çekirdeği kırmızı boyanan hücrelerin sayısı ile hücrelerin boyanma yoğunluğu dikkate alınarak (0= Boyanma yok, 1= Hafif, 2= Orta, 3= Şiddetli) semikalitatif olarak yapıldı.

3.7. DOKULARDAKİ APOPTOZİSİN BELİRLENMESİ

Bakır zehirlenmesi nedeniyle dokulardaki apoptotik hücreleri belirlemek üzere TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) metodu kullanıldı. Kesitler, In Situ Cell Death Detection, POD (Roche, Mannheim, Almanya) apoptozis kiti kullanılarak ve önerilen standart prosedüre göre boyandı. Buna göre kesitler, aseton- 3- etoksipropilamin (100 ml aseton- 2 ml 3- etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara 3 µm kalınlığında alındı. 30 dakika 58°C'lik etüvde kurutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki

antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 300 watta 5 dakika kaynatıldı. Yıkamadan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde hazırlanmış %3'lük H_2O_2 ile 10 dakika bekletildi. Kesitler TdT (terminal deoxynucleotidyl transferaz) enzimi ve işaretleme solüsyonu karışımında $37^\circ C$ 'de 1 saat tutulduktan sonra spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Peroksidaz ile konjuge anti-flouresein isotiosiyanat antikoru ile $37^\circ C$ 'de 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Kesitlerin boyanması için kromojen olarak 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) ya da 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) (Zymed DAB plus substrat, ABD) kromojenleri kullanıldı. Boyamalar mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle yapıldı. Karşıt boyamalarda AEC substrat ile boyanan kesitler Gill's hematoksilin ile boyanıp su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile, DAB ile boyanan kesitler Harris hematoksilin ile boyanıp Entellan (Merck) kullanılarak kapatıldı.

TUNEL metoduyla boyanan doku kesitlerinde apoptotik aktivitenin belirlenmesi ışık mikroskopunda yapıldı. İncelemede hücrelerin boyanma yoğunluğuna bakılmaksızın kırmızı-kahverengi boyanan çekirdekler pozitif, mavi boyanan çekirdekler negatif olarak kabul edildi. Değerlendirme boyanan hücre çekirdeği sayısına göre semikalitatif olarak yapıldı.

3.8. SERUM, YEM VE SU ÖRNEKLERİNDE BAKIR KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Çalışmada kullanılan ratların serumları ile deneme süresince ratlara verilen yem ve su örneklerindeki bakır düzeyleri, GBC Avanta SIGMA Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrisi (AAS) ile ölçüldü.

3.8.1 Serumların Hazırlanması

Deneme süresi sonunda ratların eter anestezisi altında kalplerinden kanları tek kullanımlık enjektör ile Z serum sep clot activator tüplere alındı. Alınan kanlar yarım saat süresince oda ısısında bırakılarak pıhtılaşması sağlandı. Pıhtılaşan kanlar 3500

devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar 1.5 ml'lik tüplere aktarılarak AAS'de ölçüm yapılınca kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan antikorlar

Antikor (Klon)	Antikor türü	Antikor konağı	Antijen geri alma yöntemi	Kullanılan dilüsyon	İnkubasyon süresi	Üretici firma
Cu/Zn SOD	Polyclonal	Tavşan	Proteiaz K (%0.1)	1/100	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	GeneTex
Metallothionein (E9)	Monoclonal	Fare	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/600	21°C 1 saat	Dako
ATP7B	Polyclonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/100	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	GeneTex
Ctr1	Polyclonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/250	4°C bir gece	GeneTex
Aktif Caspase 3 (CPP32)	Polyclonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/25	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Diagnostic Biosystem
Aktif Caspase 8 (FLICE)	Polyclonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/25	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Diagnostic Biosystem
Aktif Caspase 9 (LAP6 Ab-4)	Polyclonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solusyonda 600watt 15 dk	1/100	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Thermo Scientific

3.8.2 Serum Örneklerinin Ölçüme Hazırlanması

Serum örneklerinin sulandırılmasında ultra saf su kullanıldı. Örnekler 1:2 oranında ultra saf su ile sulandırıldıktan sonra bakır ölçümleri için AAS'de okutuldu (Karademir, 2007).

3.8.3 Yem Örneğinin Ölçüme Hazırlanması

Yem örnekleri organik kısım yaş yakma yöntemine göre asit yardımıyla yakıldı. Öğütülmüş kuru yem numunesinden üç paralel olacak şekilde 1 g tartılarak ısıya dayanıklı deney tüplerine alındı. Tüplerdeki yem örneklerine 12 ml nitrik asit- perklorik

asit (100 ml nitrik asit- 25 ml perklorik asit) karışımı ilave edildi. Çeker ocak altında, elektrik ocağı üzerinde, ısısı yavaş yavaş artırılarak 200°C'ye yükseltildi. Tüplerin içinde yaklaşık 1 ml berrak çözelti kalıncaya kadar yakma işlemine devam edildi. Numuneler soğuduktan sonra üzerine 15 ml ultra saf su ilave edilerek Whatman no 42 süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra 10 saat bekletilerek silisyumun dibe çökmesi sağlandı. Üstte kalan çözeltide bakır ölçümleri için AAS okutuldu, ortalama değer alındı (Karabulut ve Canbolat, 2005).

3.8.4 Ölçümlerin Yapılması

Bakır için 0.5, 1, 2, 3, 4 ppm'lik standartlar ile blank (kör) çözelti hazırlandı. GBC Avanta SIGMA AAS atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazına Cu lambası takıldı ve cihaz 324.8 nm'ye ayarlandı. Bu şekilde ölçüme hazır hale getirilen cihazda hazırlanan blank ve standart çözeltilerle kalibrasyon eğrisi çizildi ve güven aralığı 0.9998 olarak hesaplandı. Cihazın yaptığı ölçümlerin güvenilirliğini ortaya koymak için her 14 numunenin ölçümünden sonra blank ve standart çözeltiler tekrar okutuldu. Serum örnekleri, yem örnekleri ve deney süresince ratlara verilen çeşme suyunda üç defa ölçüm yapıp ortalaması alındı. Cihazın ppm (mg/l) cinsinden verdiği ölçüm sonuçları sulandırma oranlarına göre iki ile çarpıldıktan sonra µg/dl' ye çevrildi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen immunohistokimyasal bulgular Nikon DS-5M kamera ataşmanlı Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu altında görüntülendi ve mikroskopik fotoğrafları çekildi. Pozitif boyanmaların derecesi (0=Boyanma yok, 1=Az, 2=Orta, 3=Şiddetli) semikalitatif olarak değerlendirildi. Sonuçlar SAS, 2008, SAS.9.1.3, SAS CAMPUS DRIVE, Cary NC. istatistik analiz programı ile değerlendirildi. Gruplar arası farkın istatistiksel kontrollerinde Mann-Whitney testi kullanıldı. Gruplar arası farkın belirlenmesinde ise nxr khi-kare testi uygulandı. Tanıtıcı istatistikler için ortalama değerler median cinsten elde edildi.

Serumlar ile yem ve su örneklerinin AAS cihazı ile ölçülen Cu düzeyleri SAS, 2008, SAS.9.1.3, SAS CAMPUS DRIVE, Cary NC. istatistik analiz programı ile değerlendirildi. Gruplar arası farkın istatistik kontrollerinde One-Way ANOVA, grup ortalamalarının karşılaştırmasında Duncan testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Deneme gruplarına bakır sülfatın ilk uygulandığı günden itibaren ratlarda durgunluk, kambur duruş, tüylerde kabarma ve matlaşma görülmeye başlandı. Deney süresince erken ölümlere rastlanmadı. Çalışmaya alınan ratların beden ağırlıklarında çalışma süresince belirgin bir değişiklik olmadı.

4.2. MAKROSKOBİK BULGULAR

Deney süresi sonunda nekropsileri yapılan ratların mide ve bağırsak mukozalarının verilen CuSO_4 nedeniyle mavi-yeşil renge boyandığı ve gazla şişkin durumda olduğu dikkati çekti. Diğer organların görünümü normaldi.

Nekropsi yapılmadan önce eter anestezisi altında ratların kalplerinden kan alındı. II. deneme grubundaki ratlardan alınan kanların kolay hemolize olduğu görüldü.

4.3. SERUM BAKIR DÜZEYLERİ

Çalışmada kullanılan ratlara ait serumların bakır analiz sonuçlarının istatistik değerlendirmeleri yapıldı ve Tablo 3'te gösterildi. Değerlendirme sonuçları incelendiğinde I. deneme grubu, I. kontrol grubu, II. deneme grubu ve II. kontrol grubu aralarında fark olduğu belirlendi ($p < 0.01$). II. deneme grubunda serum bakır düzeyinin I. deneme grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. I. deneme grubu ve II. deneme grubu arasında, I. deneme grubu ve I. kontrol grubu arasında, II. deneme grubu ve II. kontrol grubu arasında farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).

Deneyde ratlara verilen yemden rastgele örnekleme yapıldı. Usulüne uygun olarak üç paralel şekilde hazırlanan yem örneğinin AAS ile ölçüm sonuçlarının ortalama bakır düzeyi $36.6 \mu\text{g/dl}$ olarak bulundu. Deney süresince ratlara verilen su örneklerinin AAS ile bakır düzeyleri ölçüldü ve bakır tespit edilemedi.

Tablo 3: Grupların istatistik değerlendirmeleri ile birlikte serum Cu değerleri (n=7)

	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	%95 Güven aralığında alt ortalama değer	%95 Güven aralığında üst ortalama değer	En düşük düzey	En yüksek düzey
I.Deneme Grubu	202.28 ^a	72.00	27.21	136.69	269.87	124	313
I.Kontrol Grubu	105.85 ^{bc}	8.85	3.34	97.66	114.05	96	116
II.Deneme Grubu	135.42 ^b	21.02	7.94	115.98	154.87	102	170
II.Kontrol Grubu	85.12 ^c	5.19	1.83	80.78	89.46	75	93

^{abc}: Aynı sütunda aynı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında fark yoktur (p<0.05)

4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

4.4.1 Karaciğer Bulguları

Çalışma grupları ile kontrol gruplarına ait karaciğerlerin histopatolojik incelemesi semikalitatif olarak yapıldı ve sonuçlar Tablo 4'te değerlendirildi.

Tüm ratların karaciğerinde vena sentralis, vena interlobularis ve sinuzoidlerin genişlediği, içlerinin eritrositlerle dolu olduğu belirlendi. Remark kordonlarının düzenini kaybettiği ve Kupffer hücrelerinin belirginleştiği dikkati çekti.

I. deneme grubundaki ratların karaciğerlerinde genel olarak orta düzeyde sentrilobuler parankim dejenerasyonu, periportal bölgelerde lenfositlerin çoğunlukta bulunduğu çok şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu ve safra duktuslarında hafif derecede hiperplazi görüldü. Hepatosit çekirdeklerinde karyomegali, anizokaryozis (olgu no: 1,2,3,4,6,7,8,9,10 ve 14) ve vezikül yapıları dikkati çekti. Bu gruptaki tüm ratların karaciğerinde karyolitik çekirdekli, fokal hepatosellüler nekroz alanları ile çekirdekleri büzüşmüş ve daha koyu boyanan apoptotik hepatositler görüldü (Şekil 7).

II. deneme grubundaki ratların karaciğerlerinde farklı lokalizasyon ve şiddette parankim dejenerasyonu gözlemlendi. Bazı ratlarda (olgu no: 1,2,3,4,5,6,7,8,9 ve 10) hafif şiddette, bir olguda (olgu no: 14) orta şiddette sentrilobuler parankim dejenerasyonu dikkati çekti. 11, 12 ve 13 no'lu ratlara ait karaciğerlerde diffuz karakterde şiddetli

parankim dejenerasyonu mevcuttu (Şekil 7). Periportal bölgelerde lenfositik karakterde mononükleer hücre infiltrasyonunun genelde hafif (olgu no: 1,2,3,4,5,7,8,10,14), orta (olgu no: 9 ve 11) ve bazen de şiddetli (olgu no: 6 ve 14) düzeyde olduğu gözlemlendi. Hepatosit çekirdeklerinde gözlenen vezikül oluşumları (olgu no: 12 ve 13 hariç) I. deneme grubuna göre daha hafifti. Bu gruptaki tüm ratların karaciğerlerinde tek tük apoptotik hepatositlere rastlanırken, karyolitik çekirdekli nekrotik hepatositlerin daha yaygın olduğu gözlemlendi. Çift çekirdekli hepatositlerin sayıca arttığı görüldü. Safra duktusları hafif düzeyde hiperplazikti.

Tablo 4: Karaciğerdeki histopatolojik bulguların semikalitatif değerlendirilmesi

	Hidropik değişiklik	Çekirdekte vezikül	Tek hücre nekrozu	Konjesyon	Hepatosellüler nekroz	Portal inflamasyon	Fibrozis
I. Deneme Grubu	2	2	2	1	1	3	0
I. Kontrol Grubu	0	0	0	0	0	1	0
II. Deneme Grubu	1	1	1	1	2	1	0
II. Kontrol Grubu	0	0	0	0	0	1	0

0=Yok, 1=Hafif, 2=Orta, 3=Şiddetli

4.4.2. Böbrek Bulguları

I. deneme grubundaki ratlarda kortekste genel olarak distal ve proksimal tubul epitellerinde farklı şiddetlerde parankim dejenerasyonuna ve nekroza, yer yer bazı tubulus epitellerinde hiperplaziye rastlandı. Kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda hidropik dejenerasyon dikkati çekti. Bazı tubulusların lümeninde hyalin silindirleri görüldü. Özellikle subkapsüler yerleşimli bazı glomeruluslarda atrofi, bazılarının Bowman boşluğunda genişleme ve glomeruler şişlik gözlemlendi. Bu gruptaki bazı ratlarda (olgu no: 1,2,7,10,11 ve 13) orta düzeyde fokal lenfosit infiltrasyonu ile karakterize interstisyel nefritise rastlandı. (Şekil 8).

II. deneme grubundaki ratların böbreklerinde genelde subkapsüler yerleşimli distal ve proksimal tubul epitellerinde farklı düzeylerde parankim dejenerasyonu, yer yer epitel hücrelerinde deskuamasyon ve nekroz yanında yer yer tubulus epitellerinde hiperplazi belirlendi. Bazı tubulusların lümeninde hyalin silindirleri görüldü.

Kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda hidropik dejenerasyon dikkati çekti. I. deneme grubunda genel olarak tüm ratlarda gözlenen glomeruler atrofi, II. deneme grubunda sadece dört olguda (olgu no: 3,7,8 ve 9) hafif düzeyde gözlenirken bazı glomerulusların Bowman boşluğunun genişlemiş olduğu fark edildi. Bu grupta üç olguda (olgu no: 5,6 ve 14) hafif, bir olguda (olgu no: 8) şiddetli düzeyde fokal lenfosit infiltrasyonu ile karakterize interstisyel nefritis tespit edildi. Bazı ratlarda (olgu no: 2 ve 5) pelvis bölgesinde lenfositik ve plazmasitik hücre infiltrasyonu belirlendi (Şekil 8).

4.4.3. Dalak Bulguları

I. deneme grubundaki ratlarda genel olarak özellikle kırmızı pulpa alanlarında orta düzeyde hemosiderozise ve çok çekirdekli megakaryositlere rastlandı. II. deneme grubundaki ratlarda ise çok çekirdekli megakaryositler belirlenirken, hemosiderozis sadece iki olguda (olgu no: 2 ve 14) görüldü.

4.4.4. Mide ve Bağırsak Bulguları

Deneme gruplarındaki ratların midesinin kutan mukazasının epitel tabakasında hiperplazi ve hiperkeratozis görüldü (Şekil 9). Her iki grubun mide ve bağırsaklarının propria ve submukozasında yer yer lenfosit ve eozinofil leukositlere rastlandı.

4.4.5. Kalp Bulguları

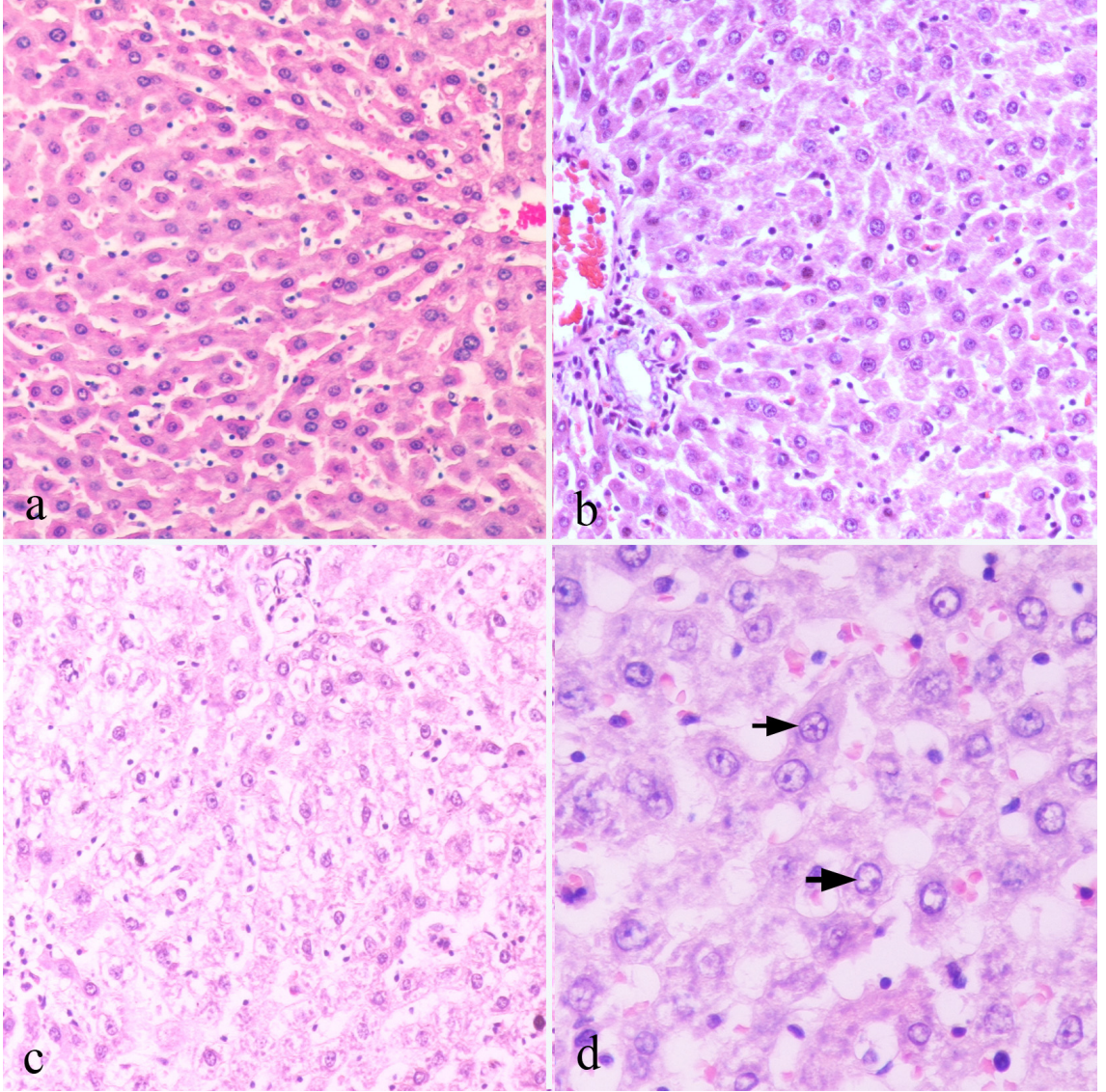
Deneme gruplarındaki olguların kalpleri histopatolojik olarak normal görünümdeydi.

4.4.6. Akciğer Bulguları

I. deneme grubundaki ratların tümünün akciğerlerinde perivasküler ve peribronşiyoller yoğun lenfosit infiltrasyonu ve hiperemi ile peribronşiyal lenfoid dokuda hiperplazi görüldü. Bu gruptaki ratların akciğerlerinde, interalveolar septal dokuda kalınlaşmaya (olgu no: 3,5,6,8,9,10), amfizeme (olgu no: 2,12), perivasküler ve peribronşiyal yerleşimli hemosiderin ile yüklü makrofajlara (olgu no: 1,4 ve 5), alveol lümenlerinde lenfosit ve alveolar makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonuna (olgu no: 6,7) rastlandı.

II. deneme grubundaki ratların akciğerlerinde genel olarak perivasküler ve

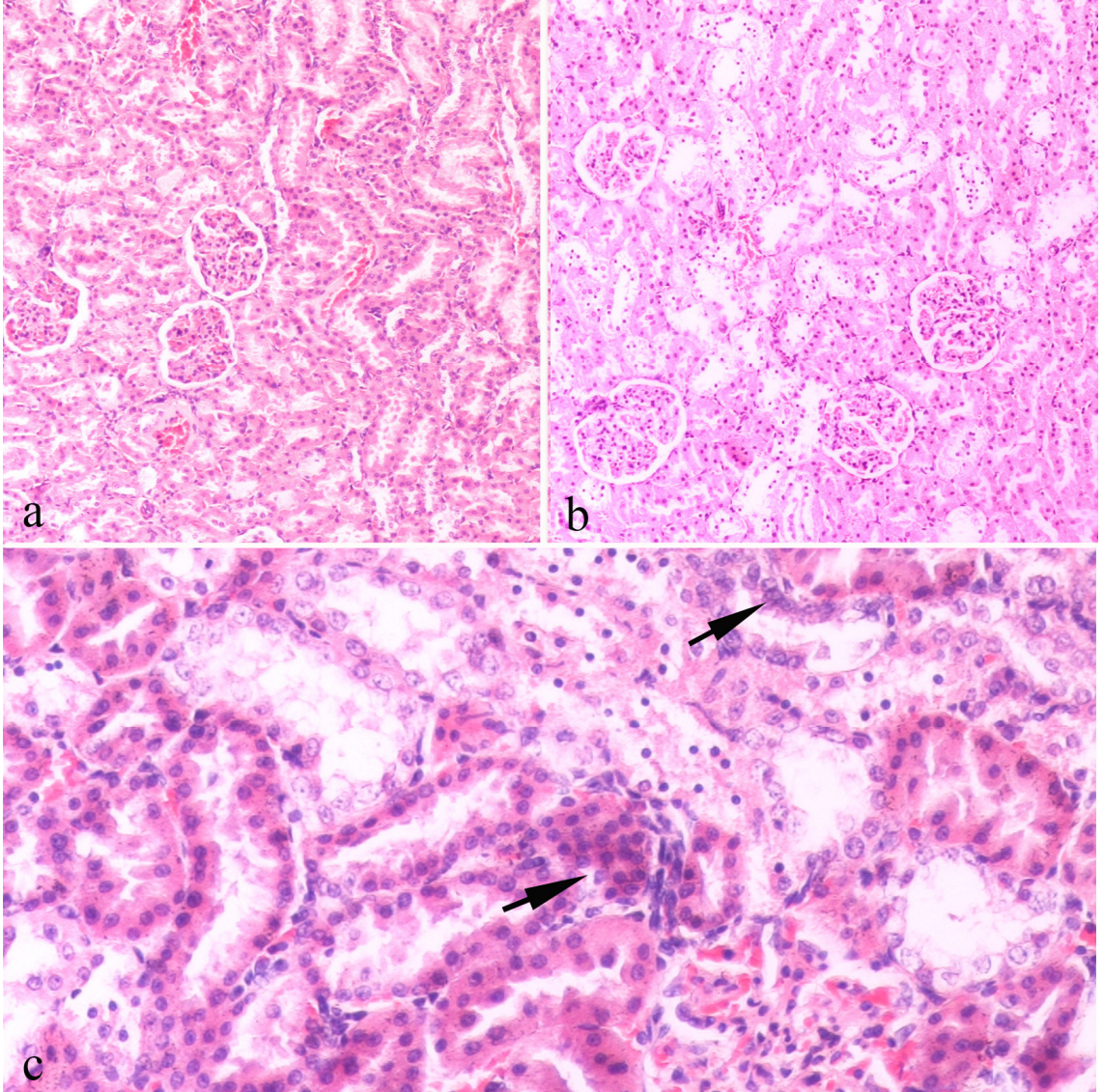
peribronşiyoler lenfositik ve plasmaitik hücre infiltrasyonu, hiperemi ve amfizem görüldü. Aynı gruptaki ratların interalveoler septal dokularında kalınlaşma (olgu no: 3,4,6,7,11,12 ve 14), alveol ve bronşiyol lumenlerinde mononükleer hücreler (olgu no: 1,2,4 ve 12) ve peribronşiyal lenfoid dokularında hiperplazi (olgu no: 1,2,5,7,12) belirlendi.



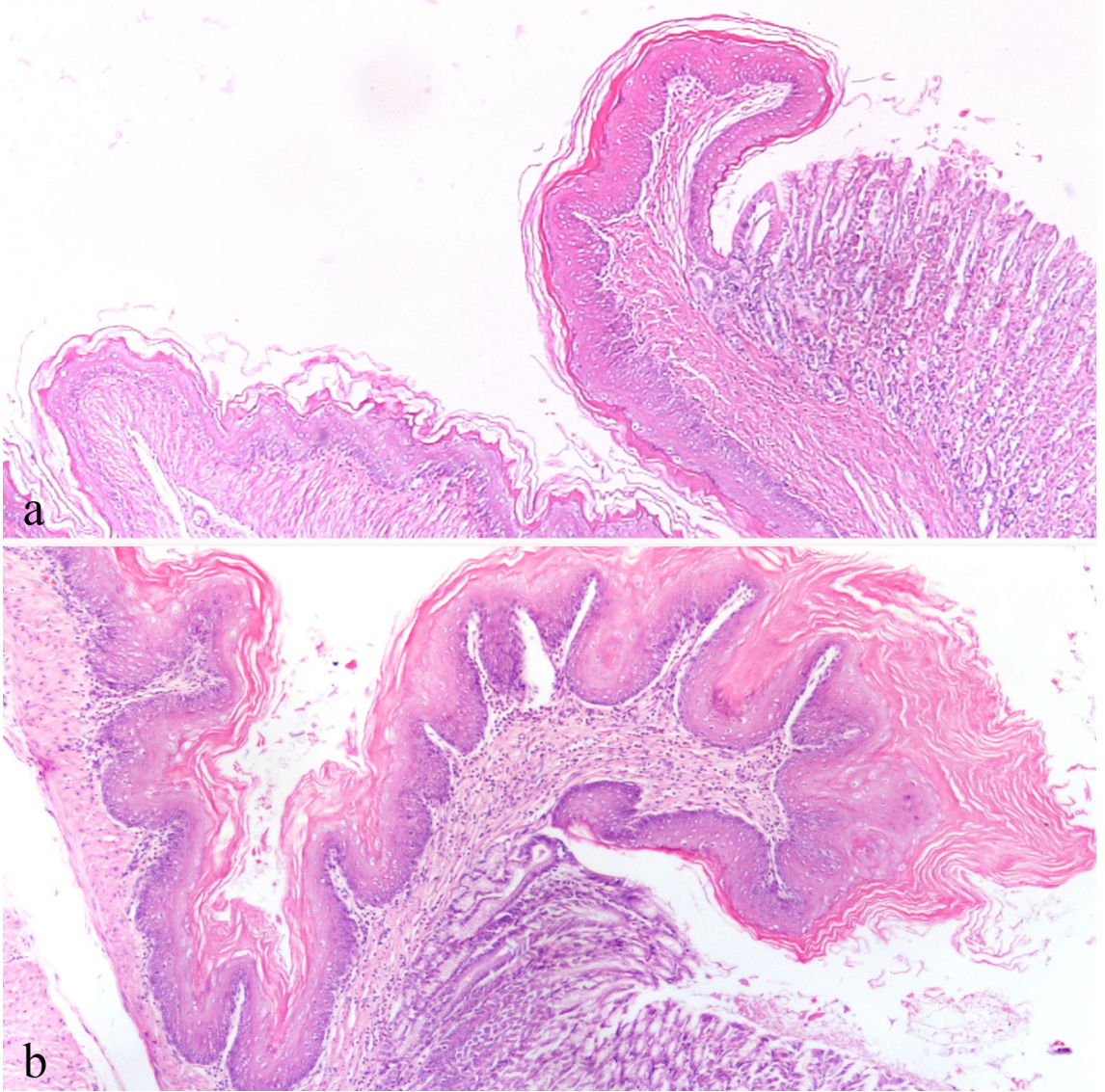
Şekil 7: Karaciğer **a:** Kontrol grubu, HE, x20 objektif, **b:** Parankim dejenerasyonu, periportal lenfosit infiltrasyonu, I. deneme grubu, HE, x20 objektif, **c:** Şiddetli parankim dejenerasyonu, II. deneme grubu, HE, x20 objektif, **d:** Hepatosit çekirdeklerinde vezikül yapıları (oklar), I. deneme grubu, HE, x40 objektif

4.4.7. Beyin ve Beyincik Bulguları

Her iki deneme grubundaki ratların beyin ve beyincikleri histopatolojik olarak normal görünümdeydi.



Şekil 8: Böbrek **a:** Kontrol grubu, HE, x10 objektif, **b:** Tubulus epitellerinde parankim dejenerasyonu ve nekroz, II. deneme grubu, HE, x10 objektif, **c:** Tubulus epitellerinde hidropik dejenerasyon, nekroz ve epitelde hiperplazi (oklar), I. deneme grubu, HE, x20 objektif



Şekil 9: Mide mukokutan birleşim yeri **a:** Kontrol grubu, HE, x4 objektif, **b:** Kutan mukozada hiperplazi ve hiperkeratoz, I. deneme grubu, HE, x4 objektif

4.5. HİSTOKİMYASAL BULGULAR

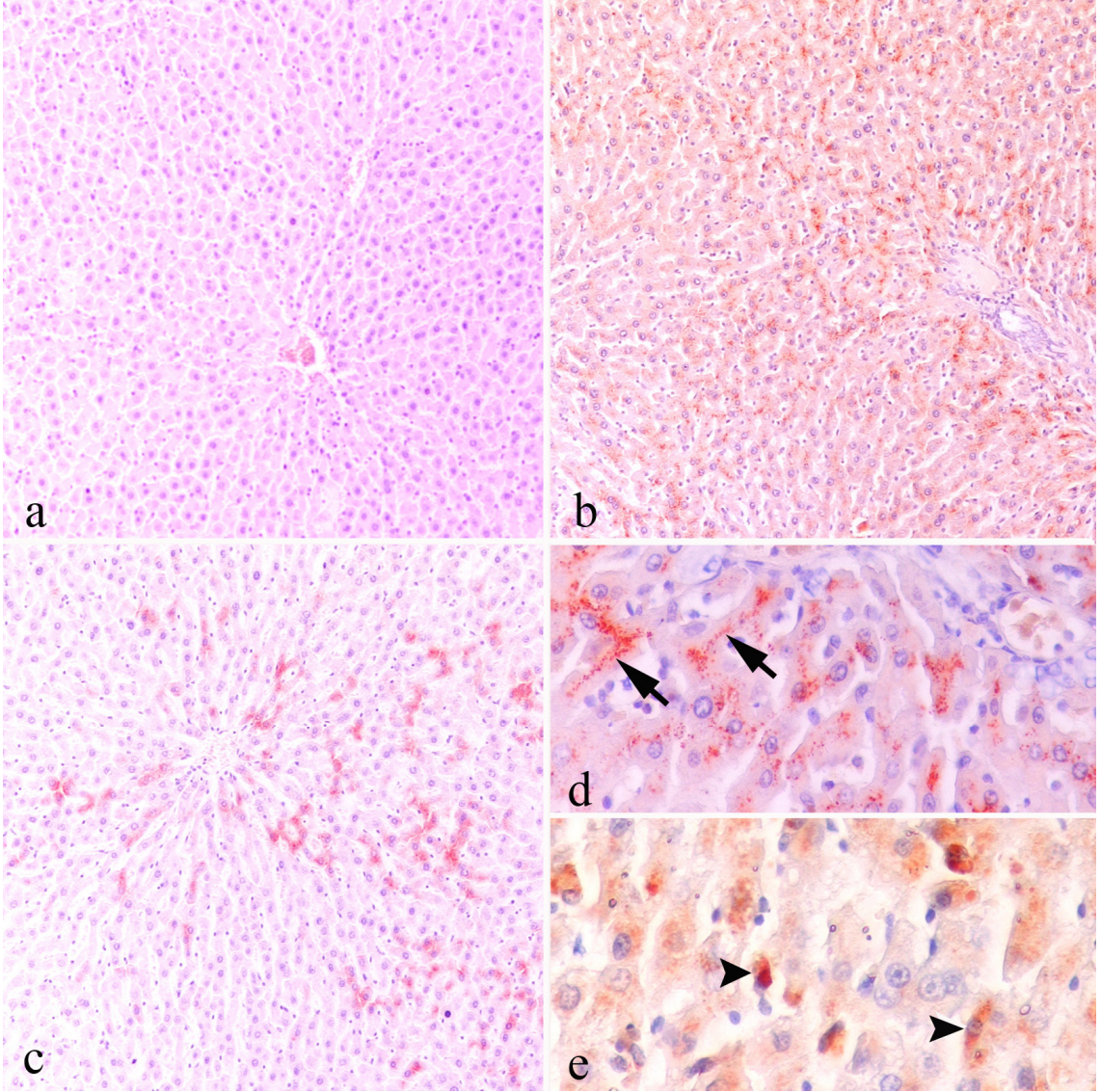
Karaciğerde, I. deneme grubundaki ratların hepatosit sitoplazmalarındaki bakır, rodanin boyası ile değişik yoğunluklarda tuğla kırmızısı renginde boyandı. Boyanma tüm lopçuklarda diffuz şekilde (olgu no: 1,2,6,7,8, 9,10,12,13), periportal bölgelerdeki hepatositlerde yoğunluğu artmış olarak (olgu no: 11,14) ya da lop içerisinde tek tük hücrelerde (olgu no: 4,5) gözlemlendi. Bir ratta (olgu no: 3) hiç boyanma olmadı. Bakır farklı büyüklüklerde granüller halinde hepatositlerin safra kanalcıkları boyunca (olgu no: 6,8,10,11,12,13, ve 14) ya da sitoplazmada yaygın şekilde (olgu no: 4,5 ve 7) boyandı. En şiddetli boyanmanın görüldüğü 7 numaralı olguda Kupffer hücrelerinin sitoplazmasında da boyanma dikkati çekti. II. deneme grubundaki ratlarda rodanin ile

boyanmanın I. deneme grubundakilere göre daha az şiddette olduğu belirlendi. II. deneme grubundaki ratların karaciğerine uygulanan rodanın boyamasında bakır, lop içerisinde dağınık hücre kümelerinin safra kanalcıkları boyunca (olgu no: 2,3,4,6,7 ve 10) ya da tek tük hücrelerin sitoplazmasında (olgu no: 1,6,8,9,11,12,13 ve 14) küçük granül halinde ve tuğla kırmızısı rengine boyandı. Kontrol gruplarındaki ratlarda boyanma gözlenmedi (Şekil 10).

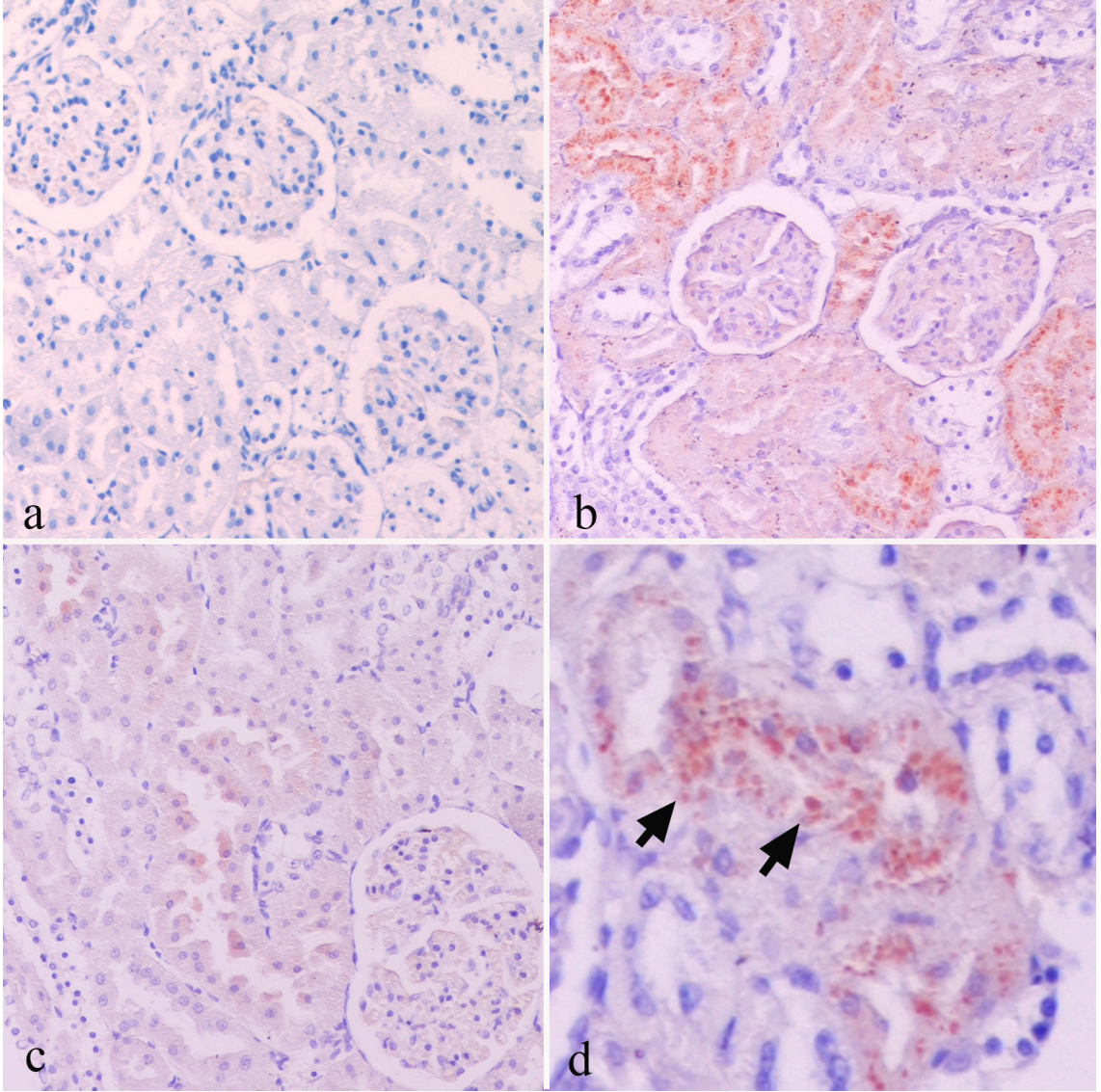
Böbrekte, I. deneme grubundaki olgulardan sadece 3 tanesinin (olgu no: 4,7,13) böbreğinde rodanın boyası ile pozitiflik saptandı. Kortikal bölgede bazı proksimal konvolut tubul epitellerinin sitoplazmasında (olgu no: 4,7,13) ve lümenlerinde (olgu no: 7) granüler tarzda ve tuğla kırmızısı rengine boyanma saptandı (Şekil 11-b, d). II. deneme grubundaki ratlardan beş tanesinde (olgu no: 3,5,11,12 ve 13) böbrekte rodanın boyası ile pozitif sonuç alındı. II. deneme grubundaki boyanma I. deneme grubuna göre daha zayıf ve granüler tarzda kortekste bazı proksimal konvolut tubul epitellerinin sitoplazmasında ve bu tubulusların lümeninde gözlemlendi. Kontrol gruplarındaki ratların böbrekleri boyanmadı (Şekil 11).

Hem deneme hem de kontrol gruplarına ait ratların incelenen diğer organlarının rodanın boyası ile boyanmadığı gözlemlendi.

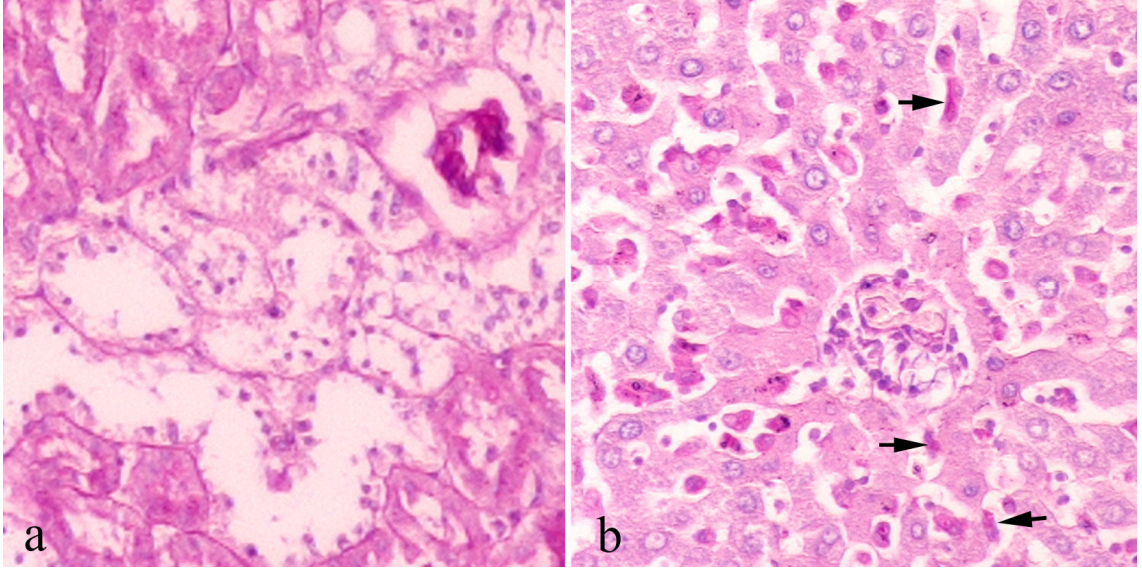
Deneme gruplarındaki olgulara ait böbreklerin tubuluslarında bazal membranının PAS boyaması ile sağlam oldukları gözlemlendi (Şekil 12). I. deneme grubundaki olguların karaciğerlerinde bazı Kupffer hücre sitoplazmalarının da PAS pozitif olduğu dikkati çekti (Şekil 12).



Şekil 10: Karaciğer, **a:** Rodanin negatif karaciğer dokusu, kontrol grubu, Rodanin, x10 objektif, **b:** Periportal bölgelerdeki hepatositlerde şiddetli bakır birikimini gösteren rodanin pozitif alanlar, I. deneme grubu, Rodanin, x10 objektif, **c:** Hepatositlerde bakır birikimini gösteren boyanma, II. deneme grubu, Rodanin, x10 objektif, **d:** Hepatositlerde safra kanalcıkları boyunca bakır birikimi gösteren granüler boyanma alanları (oklar), I. deneme grubu, Rodanin, x40 objektif, **e:** Kupffer hücrelerinde bakır birikimini gösteren boyanma (ok başları), I. deneme grubu, Rodanin, x40 objektif



Şekil 11: Böbrek, **a:** Rodanin negatif böbrek dokusu, kontrol grubu, Rodanin, x20 objektif, **b:** Proksimal ve distal tubulus epitellerinde bakır birikimini gösteren granüler tarzda boyama, I. deneme grubu, Rodanin, x20 objektif, **c:** Proksimal ve distal tubulus epitellerinde zayıf bakır birikimini gösteren boyanma, II. deneme grubu, Rodanin, x20 objektif, **d:** Granüler tarzda rodanin pozitif boyanan tubulus epitel (oklar) hücreleri, I. deneme grubu, Rodanin, x20 objektif



Şekil 12: **a:** Dejenere proksimal ve distal tubuluslarda sağlam bazal membranlar, böbrek, I. deneme grubu, PAS, x10 objektif, **b:** Kupffer hücreleri (oklar), karaciğer, I. deneme grubu, PAS, x20 objektif

4.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

I. ve II. deneme grupları ile kontrol gruplarına ait karaciğer, böbrek, dalak, mide- bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularına Ctr1, ATP7B, MT, Cu/Zn SOD antikorlarıyla yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen bulguların semikalitatif değerlendirme sonuçları ve istatistiksel verileri Tablo 5’te gösterilmiştir. Aynı gruplar ve aynı dokularda kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 antikorları ve TUNEL metoduyla elde edilen semikalitatif değerlendirme sonuçları ve istatistiksel veriler ise Tablo 6’da sunulmuştur.

4.6.1. Ctr1

Zehirlenme oluşturulan I. deneme grubu ve II. deneme grubundaki ratlar ile kontrol grubundaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularına Ctr1 antikoruna uygulandı ve sonuçları Tablo 5’te gösterildi.

I. deneme grubundaki ratların karaciğerinde hepatositlerin sitoplazmasında özellikle hücre membranına yakın ve membran boyunca çizgisel tarzda yoğun, II. deneme grubundaki ratlarda ise hepatosit membranlarında hafif düzeyde immunoreaksiyon görüldü. Kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinde sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasında, diğer alanlardaki hepatositlerin ise hücre membranında homojen hafif düzeyde boyanma dikkati çekti (Şekil 13).

Tablo 5: Dokulara yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen bulguların semikalitatif değerleri ve istatistiksel farklılıkları belirten değerler (n=10)

Organlar	Çalışma Grupları	Ctr1	ATP7B	MT	Cu/Zn SOD
Karaciğer	I. Deneme Grubu	2 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^b	2 ^b	1 ^b	1 ^b
	Kontrol Grubu	2 ^a	1 ^c	0 ^a	1 ^b
Böbrek	I. Deneme Grubu	3 ^a	2 ^a	2 ^b	1 ^b
	II. Deneme Grubu	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a
	Kontrol Grubu	3 ^a	1 ^b	1 ^c	1 ^b
Dalak	I. Deneme Grubu	2 ^a	2 ^a	0 ^a	1 ^b
	II. Deneme Grubu	2 ^a	1 ^b	0 ^a	1 ^b
	Kontrol Grubu	1 ^b	1 ^b	0 ^a	2 ^a
Mide	I. Deneme Grubu	2 ^a	1 ^a	0 ^a	3 ^a
	II. Deneme Grubu	2 ^a	1 ^a	0 ^a	3 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^b	1 ^a	0 ^a	2 ^b
Bağırsak	I. Deneme Grubu	1 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^a
	II. Deneme Grubu	2 ^b	0 ^a	1 ^a	0 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^c	0 ^a	1 ^a	0 ^a
Kalp	I. Deneme Grubu	2 ^a	2 ^b	0 ^a	2 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^b	2 ^b	0 ^a	2 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^b	2 ^b	0 ^a	1 ^b
Akciğer	I. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^a	0 ^b	0 ^a	0 ^a
Beyin	I. Deneme Grubu	1 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
Beyincik	I. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a

a, b, c, aynı harfi taşıyan sütunlarda grup ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0.05$), (Semikalitatif değerler median cinsten elde edilen ortalama değerlerdir)

Böbreğin Ctr1 ile immunohistokimyasal boyamasında I. deneme grubu'na ait ratlarda korteksten kortikomedullar bölgeye doğru devam eden distal tubul epitellerinin

sitoplazmasının bazal kısımları oldukça şiddetli, proksimal tubul epitellerinin bazali ise hafif boyandı. Kortikomedullar birleşim yerindeki Henle kulpu epitellerinin bazalinin hafif, pelvis renalis'teki transisyonel epitellerin sitoplazmasının homojen ve orta şiddette boyandığı görüldü. II. deneme grubundaki ratların böbreğinde ise distal tubul epitellerinin boyanma yoğunluğunun I. deneme grubundakilerle aynı ya da daha hafif, proksimal tubul epitellerinin bazaldan çekirdeğe kadar ulaşan hafif bir immunoreaksiyon gösterdiği dikkati çekti. Kontrol böbreklerinde Ctr1 antikoru ile boyanmanın II. deneme grubuna benzer olduğu görüldü. Ayrıca tek tük bazı proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasının şiddetli boyandığı dikkati çekti (Şekil 14).

Deneme gruplarındaki ratların dalağında Ctr1 antikoru ile yapılan boyamada, beyaz pulpanın germinal merkezinde yer alan bazı hücrelerin sitoplazmasının orta düzeyde, kırmızı pulpada ise, çok sayıda (lenfoid?) hücrenin sitoplazmasının daha yoğun boyandığı görüldü. Kontrol gruplarındaki boyanmanın çalışma gruplarındaki ile aynı bölgelerde şekillendiği ancak çok daha zayıf olduğu dikkati çekti (Şekil 15).

Ctr1 antikoru ile ratların midelerinin kutan mukozasında granülozum tabakası hücrelerinin deneme gruplarındakilerde daha yoğun, kontrol gruplarında ise zayıf immunoreaksiyon verdiği görüldü (Şekil 16). Midenin glandular mukozasındaki parietal hücreler Ctr1 antikoru ile deneme gruplarında oldukça yoğun, kontrollerde ise daha hafif şiddette reaksiyon verdi (Şekil 16). Deneme gruplarında duodenumda enterositler ve goblet hücrelerinin salgıları boyanırken, ileumda boyanma olmadı. Kolonda ise luminal enterositlerin boyandığı, ancak II. deneme grubunda boyanan hücre sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Kontrol gruplarına ait bağırsaklarda boyanma gözlenmedi (Şekil 17). Deneme grupları ile kontrol gruplarında mide ve bağırsakların tunika muskularisindeki düz kas tellerinin hafif ve granüler tarzda boyandığı görüldü.

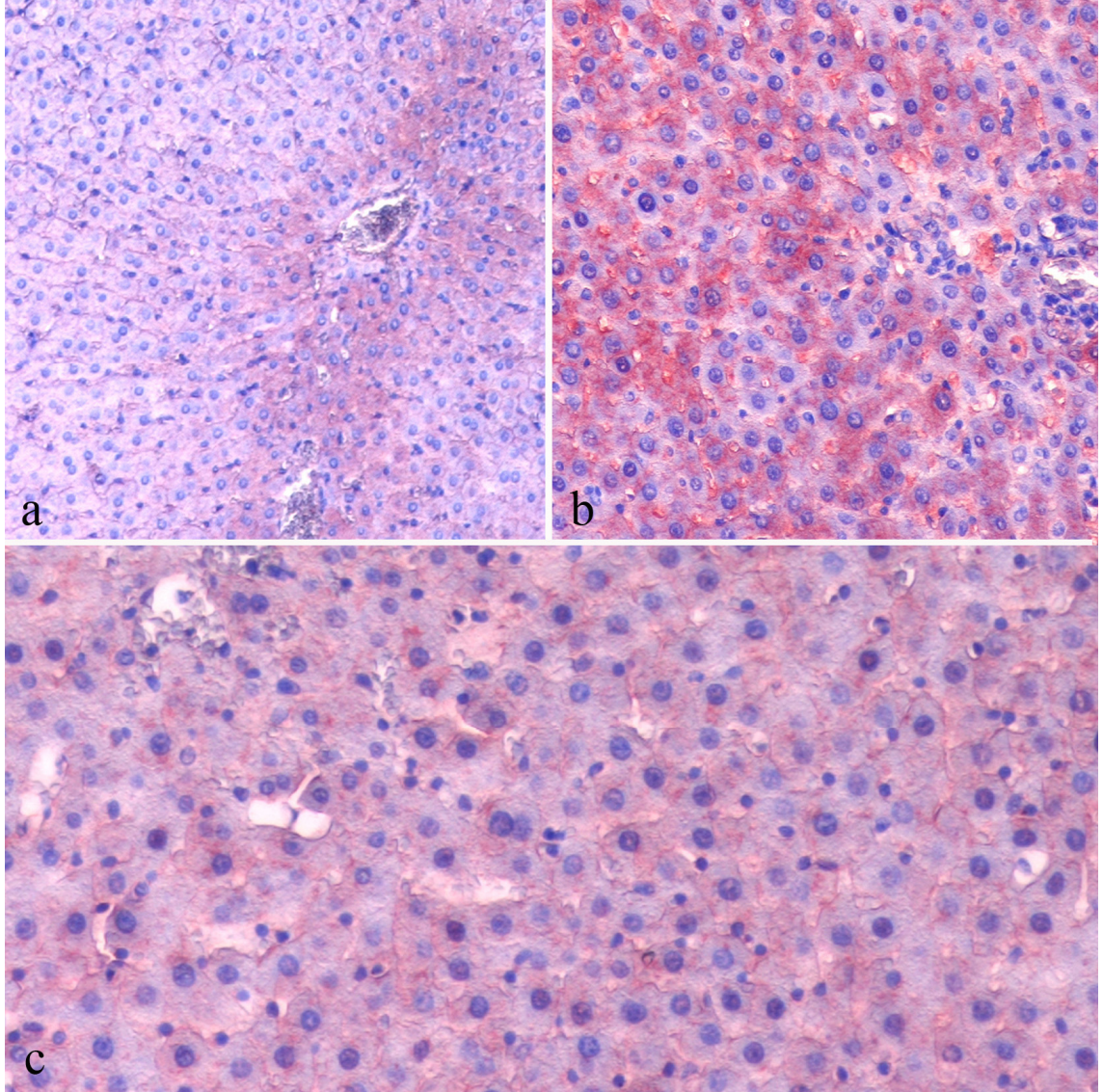
I. deneme grubundaki olguların kalplerinde bazı kas tellerinin sitoplazmasının Ctr1 ile genelde diffuz ve orta şiddette, bazı bölgelerin ise daha şiddetli boyandığı görüldü. II. deneme grubu ve kontroldeki olguların kalp kası tellerinin I. deneme grubu ile aynı karakterde ancak daha hafif şiddette boyandığı dikkati çekti (Şekil 18).

Her iki deneme grubunda akciğerlerde peribronşial lenfoid dokuda bazı mononükleer hücrelerin, interalveolar septal dokudaki bazı hücrelerin, alveolar makrofajların ve bronşlardaki goblet hücrelerinin salgılarının Ctr1 ile immunopozitif boyandığı görüldü. Kontrol gruplarında ise peribronşial bölgede az sayıda lenfoid hücre

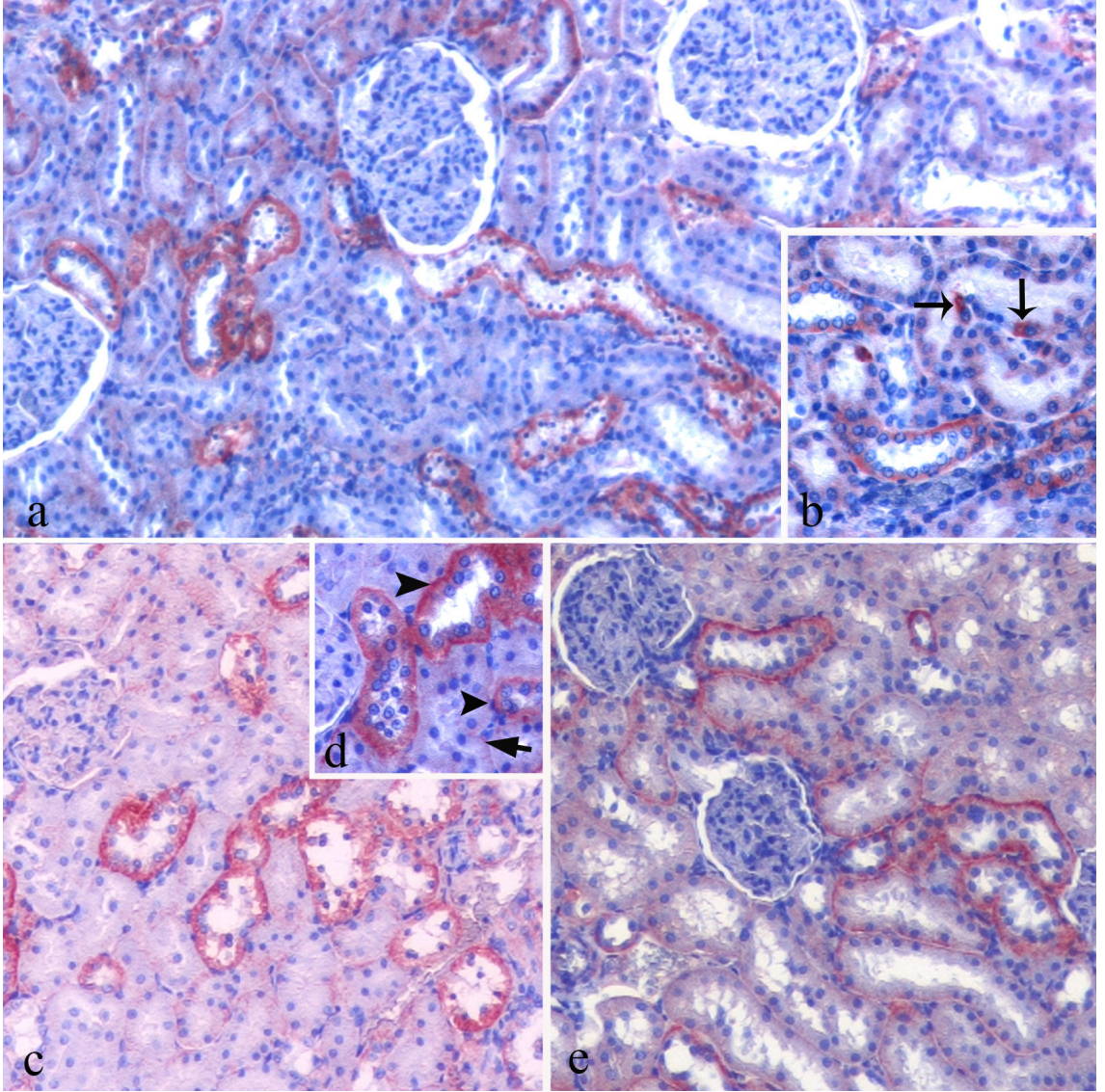
ile bronşlardaki goblet hücrelerinin salgılarının boyandığı dikkati çekti.

Beyinde kornu ammonis bölgesinde hem nöropil hem de bazı nöronlarda boyanma gözlemlendi.

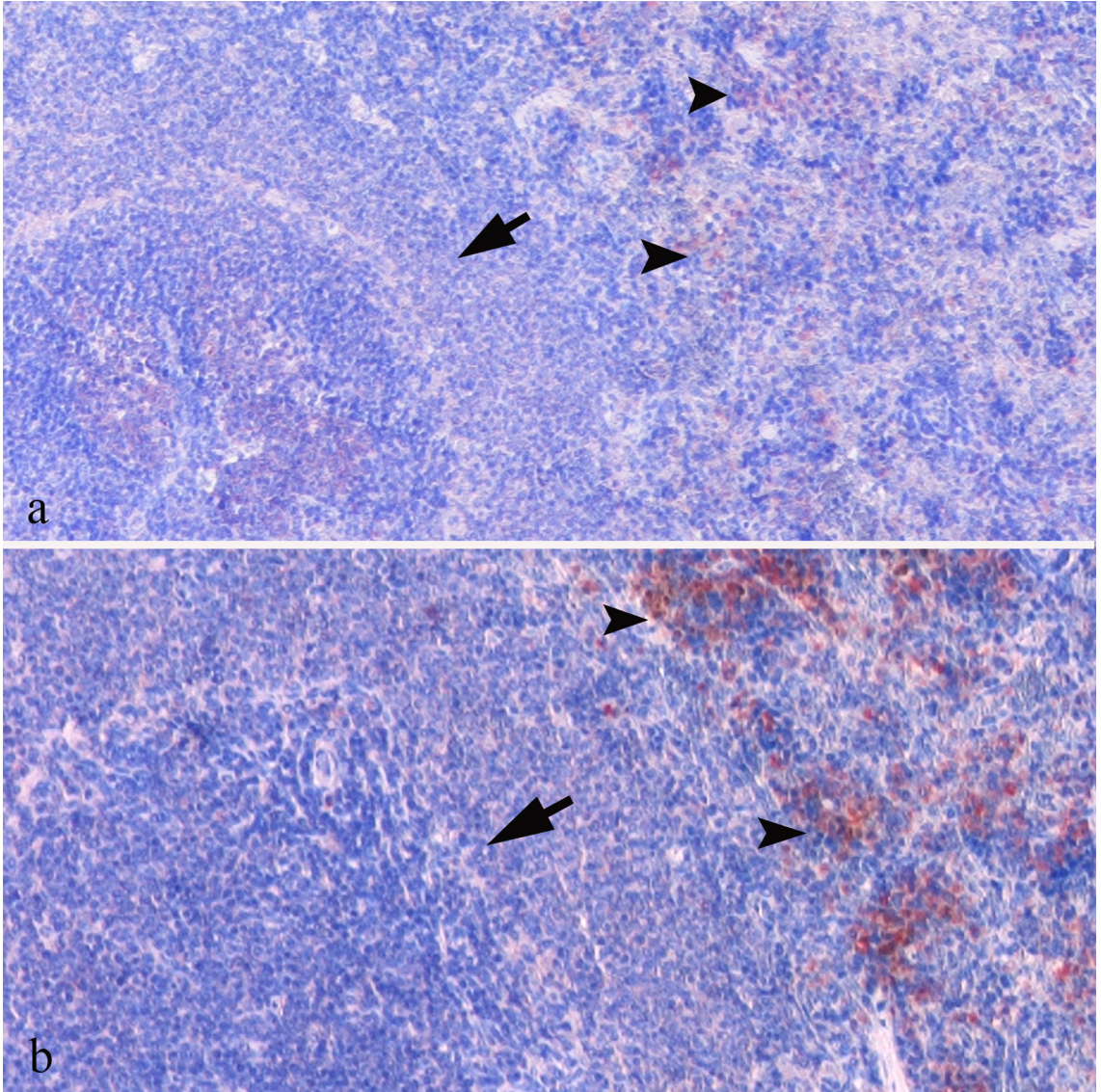
Deneme ve kontrol gruplarındaki olgularda beyincikte Purkinje hücrelerinin sitoplazması ile beyinciğin bazal nöronlarının bazılarının sitoplazması şiddetli boyandı.



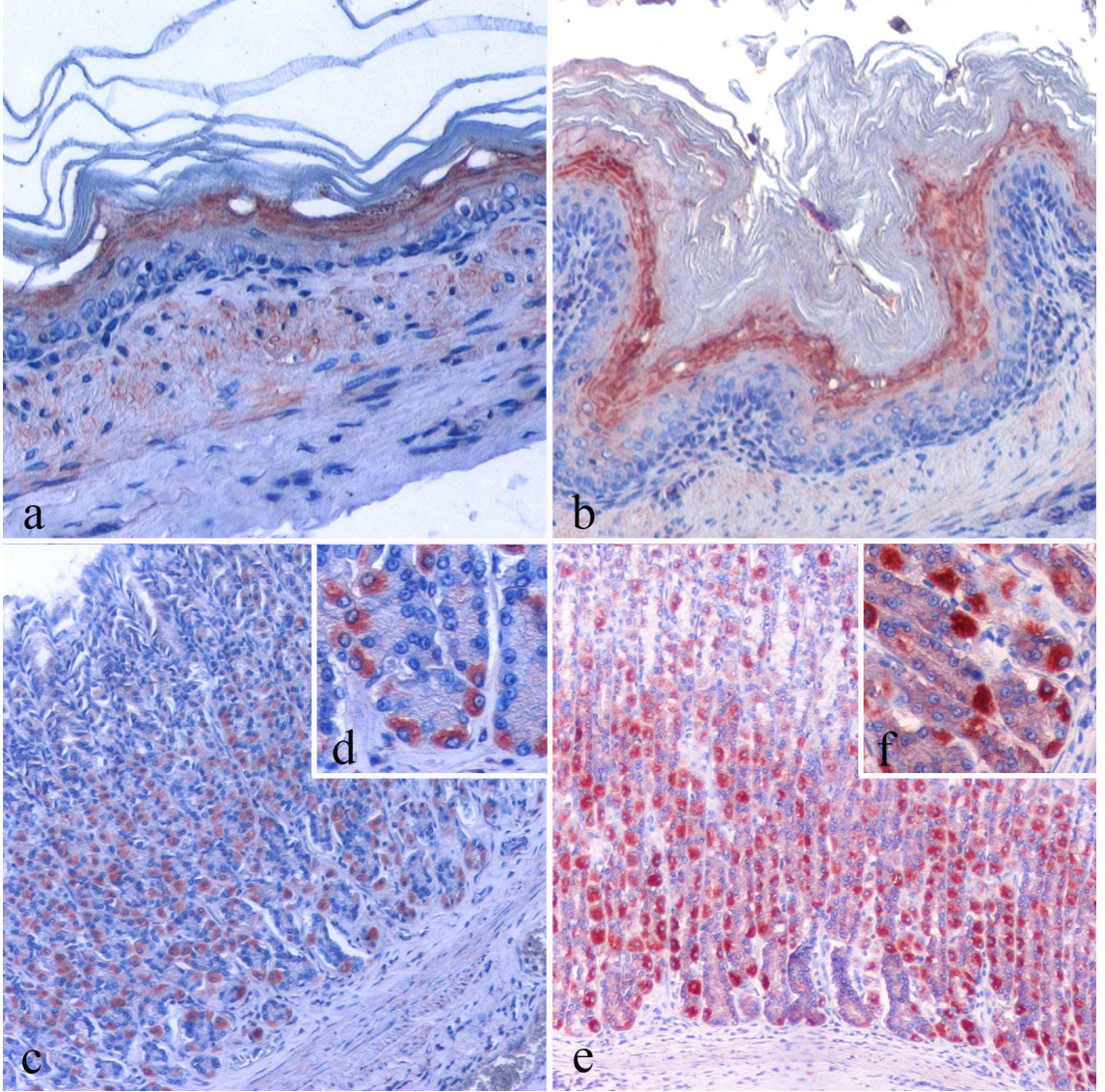
Şekil 13: Ctrl1, karaciğer, **a:** Sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazması ve midzonal bölgedeki hepatositlerin hücre membranında immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Hepatositlerin sitoplazmalarının periferi ve hücre membranında şiddetli immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Hepatositlerin hücre membranında zayıf immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



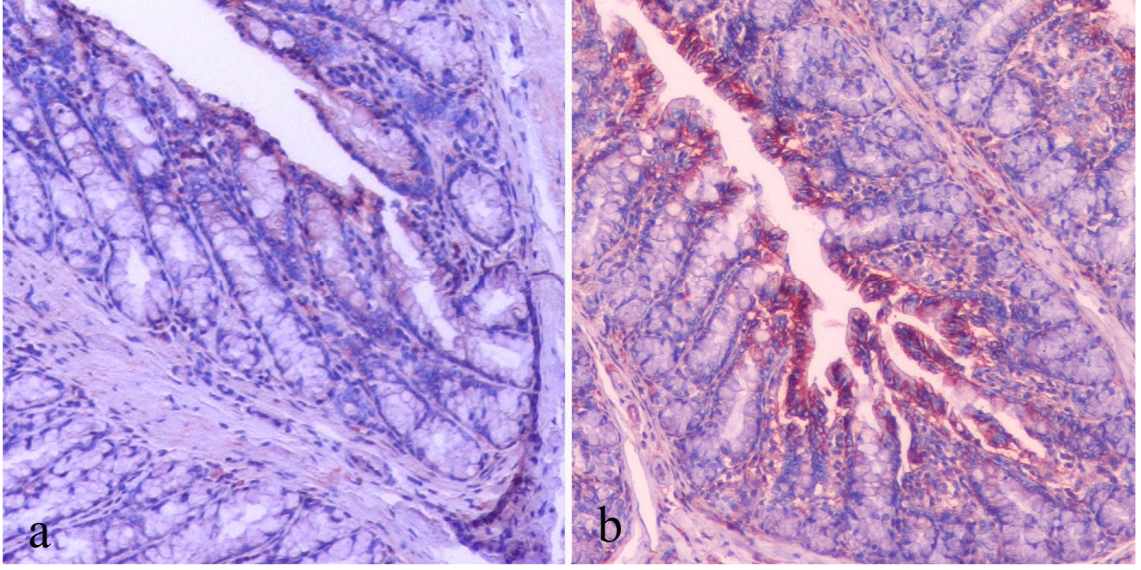
Şekil 14: Ctr1, böbrek, **a:** Distal tubul epitellerinde şiddetli, proksimal tubul epitellerinde bazaldan çekirdeğe kadar ulaşan hafif immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Bazı proksimal tubul epitellerinde şiddetli boyanma (oklar), kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Distal tubul epitellerinde şiddetli, proksimal tubul epitellerinin bazalinde hafif immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **d:** Proksimal (ince ok) ve distal tubuldeki (ok başı) pozitif boyanma, yakın çekim, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **e:** Distal ve proksimal tubul epitellerinde I. deneme grubuna göre daha hafif şiddette immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif



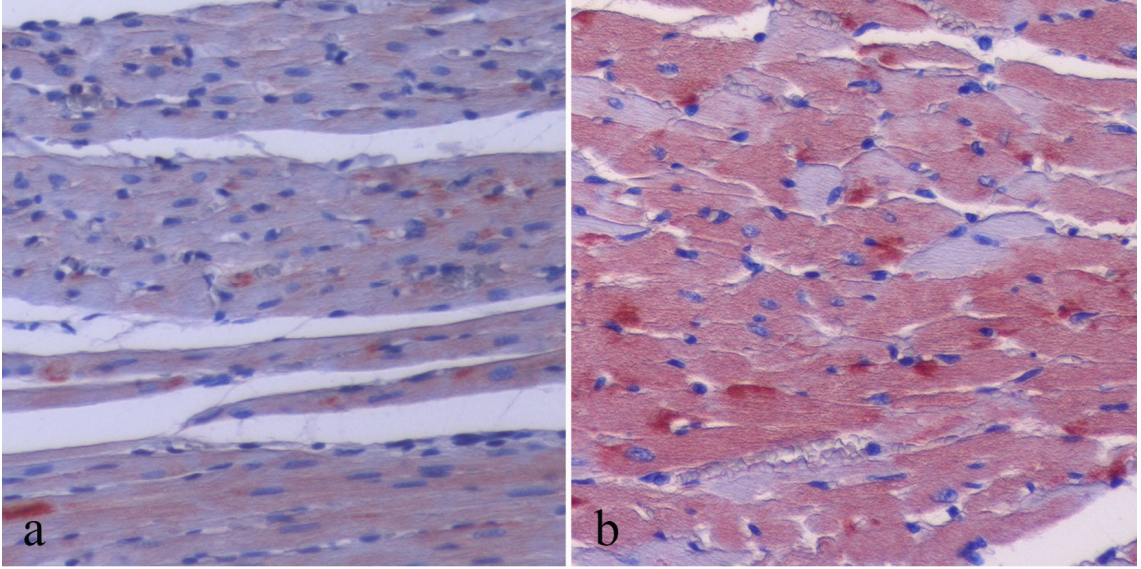
Şekil 15: Ctrl1, dalak, **a:** Beyaz pulpa(ok) ve kırmızı pulpada (ok başları) lenfoid hücrelerde zayıf immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Beyaz pulpada (ok) az, kırmızı pulpada (ok başları) çok sayıda lenfoid hücrede yoğun immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 16: Ctrl1, mide, **a:** Midenin kutan mukozasında granülozum tabakası hücrelerinde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Midede kutan mukozanın granülozum tabakası hücrelerinde yoğun immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Midenin glandular mukozasında parietal hücrelerde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **d:** Midenin parietal hücrelerinde pozitif boyanma yakın çekim, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **e:** Midenin parietal hücrelerinde daha yoğun immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **f:** Midede parietal hücrelerde daha yoğun pozitif boyanma yakın çekim, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif



Şekil 17: Ctr1, kolon, **a:** Kolonun luminal enterositlerinde çok hafif pozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Luminal enterositlerinde daha yoğun pozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif



Şekil 18: Ctr1, kalp, **a:** Kardiyomyositlerde hafif immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Kardiyomyositlerde yoğun immunopozitif boyanma I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

4.6.2 ATP7B

ATP7B antikoru ile deneme ve kontrol gruplarındaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularında yapılan immunohistokimyasal çalışma sonuçları Tablo 5'te gösterilmektedir.

ATP7B ile yapılan boyamada, I. deneme grubundaki çoğu olgunun karaciğerlerinde tüm hepatositlerin sitoplazması şiddetli ve homojen boyandı. Sadece

bir olguda (olgu no: 8) boyanmanın perikanaliküler bölgelerde ve granüler tarzda olduğu dikkati çekti. II. deneme grubundaki ratların karaciğerlerinde sentrilobuler yerleşimli bazı hepatositlerin sitoplazması hafif düzeyde homojen boyanırken, bazı hepatositlerin çekirdeklerinin de boyandığı görüldü. Kontrol gruplarında sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmalarının orta şiddette homojen, midzonal ve periportal bölgelerdeki hücrelerin ise özellikle çekirdeklerinin boyandığı dikkati çekti (Şekil 19). Tüm gruplarda periportal bölgelerdeki bazı bağ doku hücrelerinin sitoplazmasının ATP7B antikoruna ile immunoreaksiyon verdiği görüldü.

I. deneme grubundaki böbreklerin korteksinde proksimal tubul epitellerinin sitoplazması ATP7B ile diffuz ve yoğun boyanırken, dejenere ve hiperplastik hücrelerin sitoplazmasının granüler tarzda boyandığı görüldü. II. deneme grubundaki böbreklerde korteksten kortikomedullar bölgeye doğru I. deneme grubuna göre daha az sayıda proksimal tubul epitelinin sitoplazması daha hafif homojen boyandı. Kontrol gruplarına ait böbreklerin korteksinde proksimal tubul epitellerinin sitoplazması homojen karakterde hafif boyanırken, bazı hücrelerin çekirdeklerinin de boyandığı dikkati çekti (Şekil 20).

İncelenen tüm gruplardaki ratlara ait dalakların kırmızı pulpasında ATP7B antikoruna ile sitoplazması yoğun boyanmış mononükleer hücrelere rastlandı. Ancak I. deneme grubundaki ratlarda boyanan hücre sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

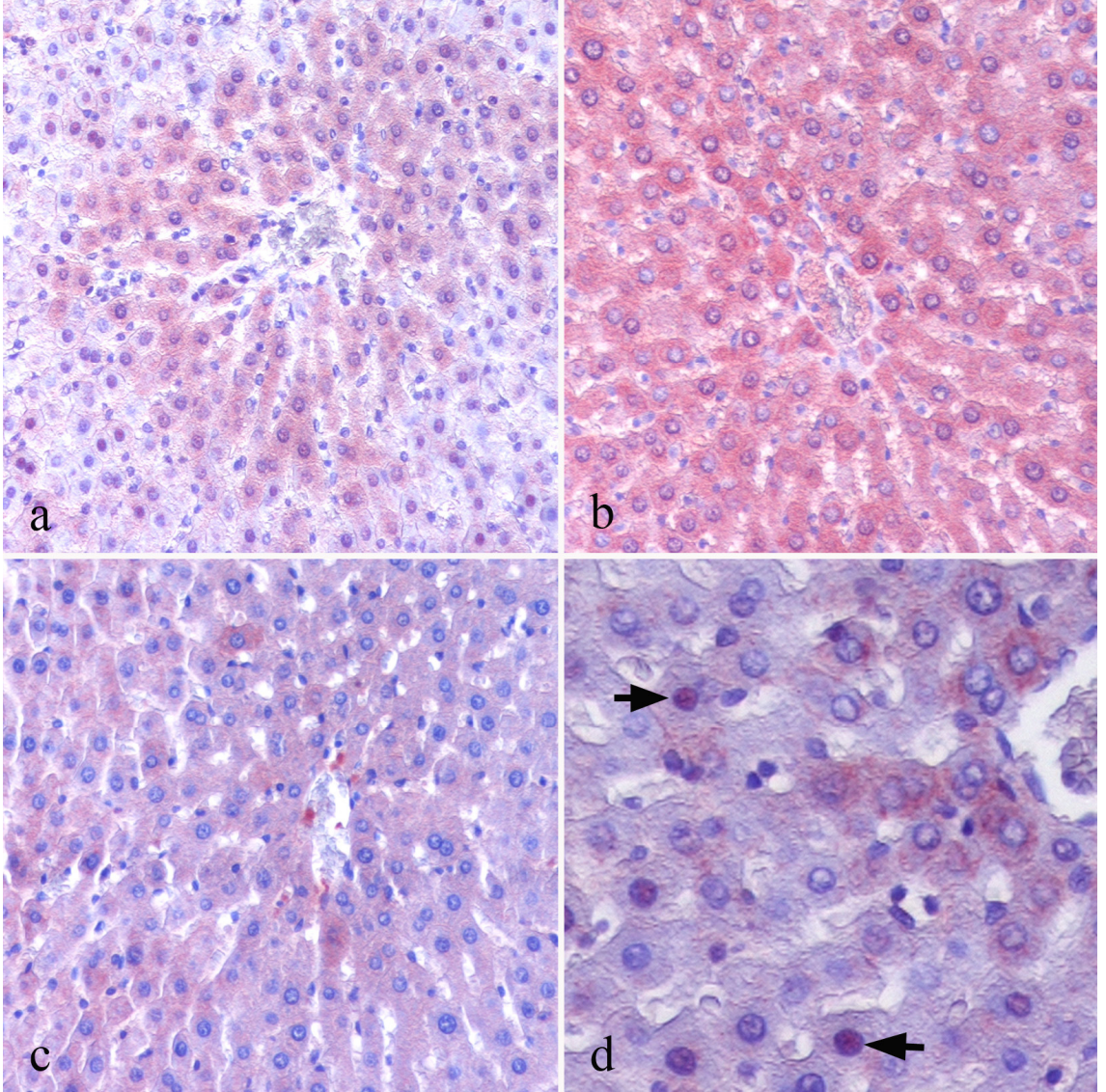
ATP7B antikoruna ile sindirim kanalı içerisinde sadece midede boyanma gözlemlendi. Midedeki boyanma deneme ve kontrol gruplarında benzer olup, midenin glandular mukozasındaki parietal hücrelerin sitoplazmasında benek tarzındaydı.

I. ve II. deneme ile kontrol gruplarındaki ratların kalp kası tellerinin sitoplazmasının ATP7B antikoruna ile boyandığı gözlemlendi. Ancak kontrol gruplarındaki ratlarda boyanma yoğunluğunun biraz daha fazla olduğu dikkati çekti. Pozitif reaksiyon kas telleri arasındaki bazı hücrelerin sitoplazmasında ise daha şiddetliydi.

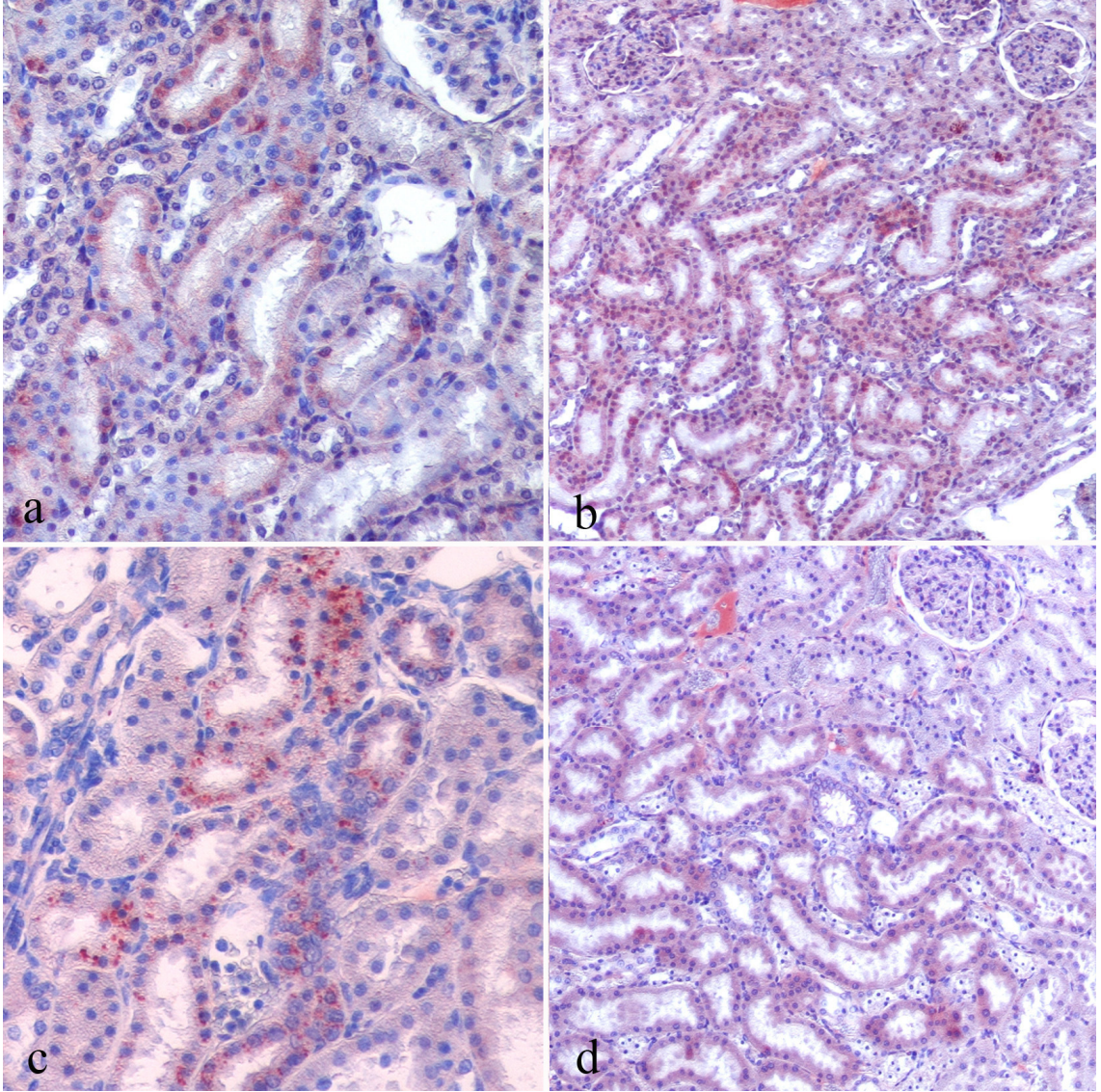
Deneme ve kontrol gruplarına ait akciğer parankiminde ATP7B antikoruna ile boyanma gözlenmedi, ancak deneme gruplarında bronşların çevresindeki lenfoid dokuda immunopozitif hücrelere rastlandı.

Her iki deneme grubu ile kontrol gruplarındaki rat beyinlerinin korteks ve talamus'unda yer alan nöronlardaki boyanma, perinükleer olarak orta şiddette ve homojen karakterdeydi.

ATP7B antikoru ile, deneme ve kontrol gruplarındaki ratların beyinciklerinde Purkinje hücrelerinin ve serebellar nükleuslardaki bazı nöronların perinükleer bölgelerinin boyandığı tespit edildi.



Şekil 19: ATP7B, karaciğer, **a:** Sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasında pozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Hepatositlerin sitoplazmasında diffuz şekilde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Sentrilobuler yerleşimli bazı hepatositlerin sitoplazmasında immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasında orta şiddette immunopozitif boyanma, midzonal ve periportal bölgelerdeki bazı hepatositlerin çekirdeklerinde pozitif boyanma (oklar), II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 20: ATP7B, böbrek, **a:** Proksimal tubul epitellerinde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasında immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Dejenere ve hiperplastik tubulus epitellerinde granüler boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Az sayıda proksimal tubul epitellerinde sitoplazmasında immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif

4.6.3 Metallotionein

Deneme ve kontrol gruplarındaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularına MT antikoru ile yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 5'te özetlenmektedir.

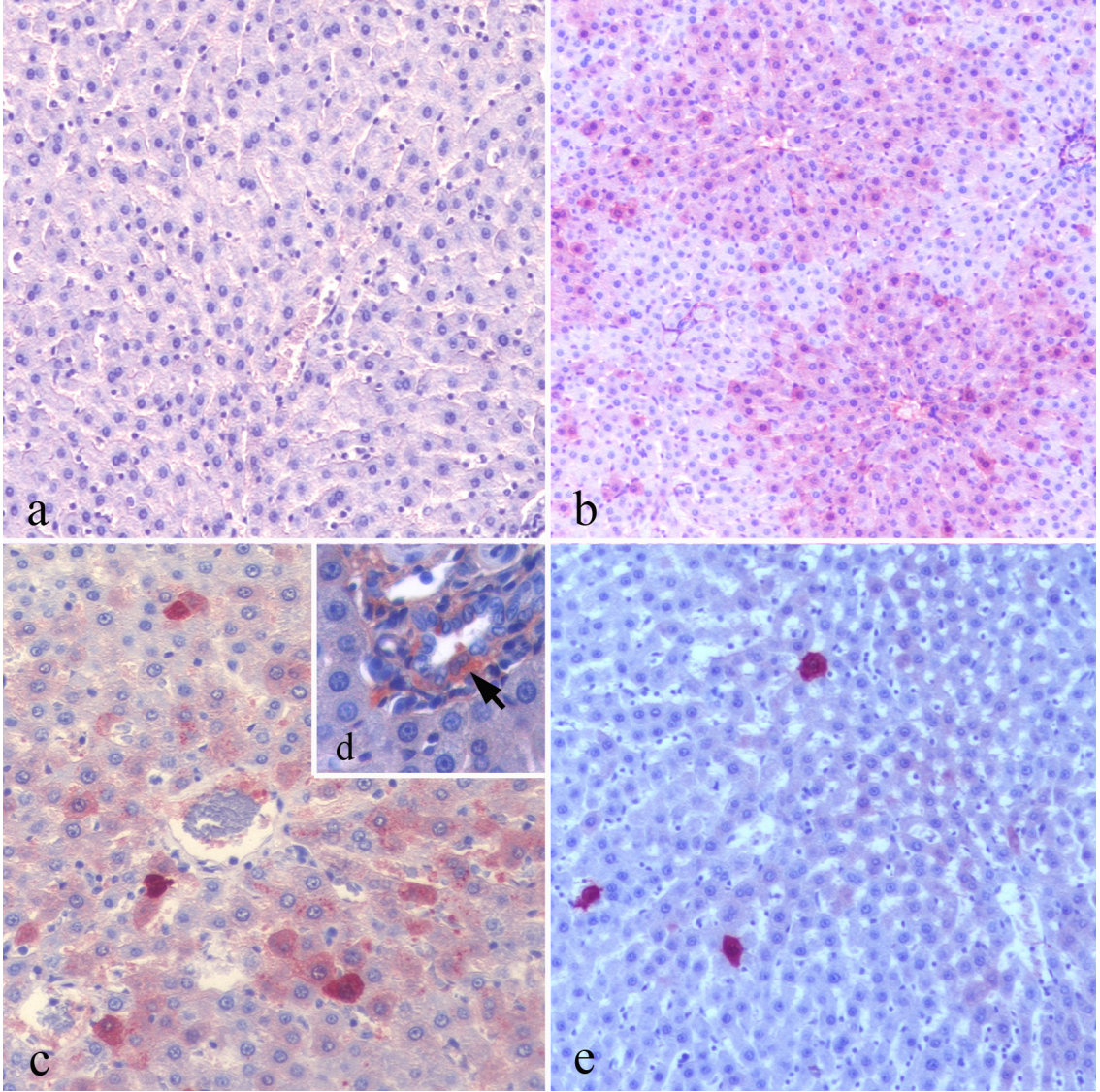
Metallotionein antikoru ile yapılan boyamada I. deneme grubundaki ratların karaciğer kesitlerinde çoğu hepatositte sitoplazmik ve nükleer boyanma gözlemlendi. Özellikle sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazması genelde homojen hafif

düzeyde boyanmasına rağmen arada bazı hücrelerin granüler tarzda orta düzeyde, tek tük bazılarının da çok şiddetli boyandığı dikkati çekti. Ancak sitoplazması boyanan hepatositlerin hepsinin çekirdeklerinde boyanma gözlenmedi. Ayrıca I. deneme grubundaki olgularda bazı safra kanal epitellerinde boyanma gözlendi (Şekil 21-d). II. deneme grubundaki ratlarda özellikle sentrilobuler bölgelerde daha az sayıda hepatositte I. deneme grubu ile aynı tarzda boyanma belirlendi. Kontrol gruplarında boyanma olmadı (Şekil 21).

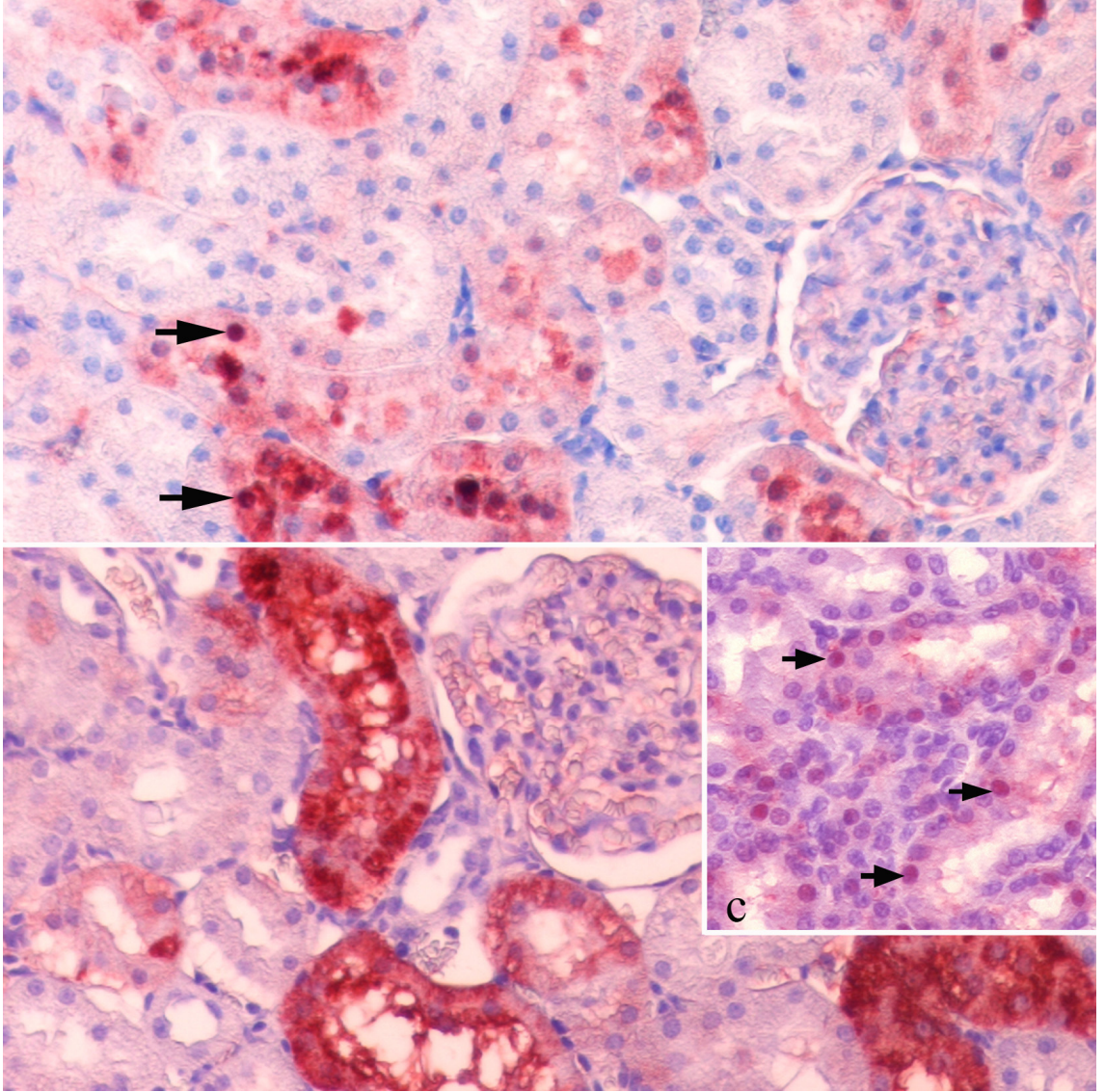
Deneme grupları ile kontrol gruplarına ait böbreklerde MT antikoru ile özellikle proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasının ve bu hücrelerden bazılarının çekirdeklerinin immunopozitif boyandığı gözlendi. Boyanan hücreler aynı olmasına rağmen, II. deneme grubu I. deneme grubuna göre, deneme gruplarında kontrole göre daha şiddetli boyandı. Deneme gruplarındaki proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasının bazal ve apikal bölgelerinin yoğun ve çizgili tarzda, kontrollerin ise daha zayıf, segmental ve granüler karakterde boyandığı görüldü (Şekil 22).

Deneme ve kontrol gruplarındaki ratların MT antikoru ile midelerinde boyanma görülmezken, duodenum ve ileumunda submukozaya komşu en bazalde lokalize olan hücrelerin sitoplazması şiddetli tarzda boyandı. Kontrol grubunda çalışma gruplarına oranla daha fazla sayıda hücrenin boyandığı görüldü (Şekil 23).

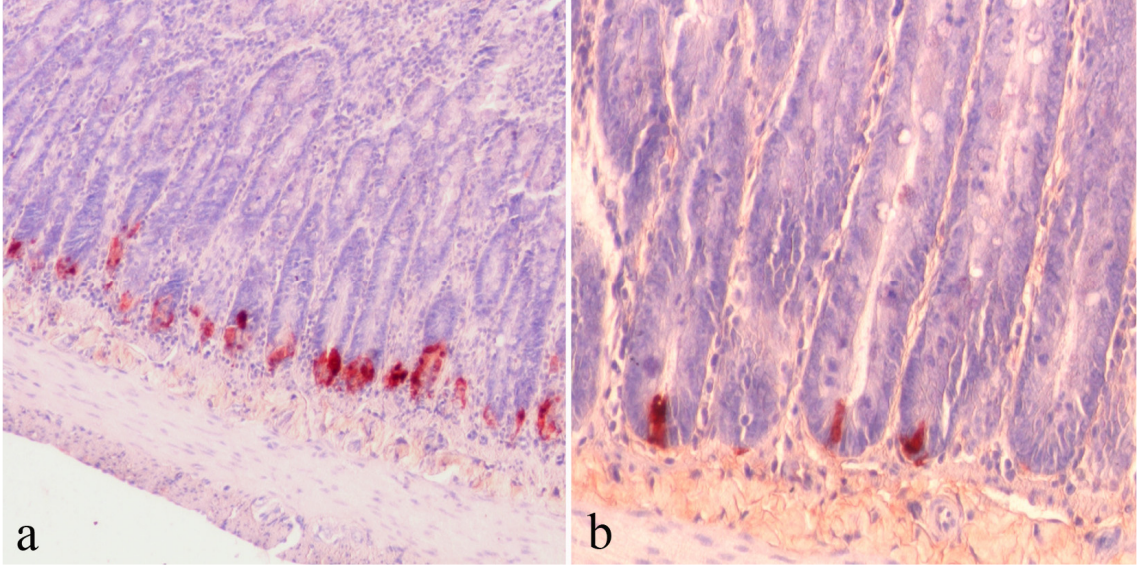
Çalışma ve kontrol gruplarındaki ratların dalak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokuları, MT antikoru ile immunoreaksiyon vermedi.



Şekil 21: MT, karaciğer, **a:** Negatif immun boyanma, Kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Özellikle sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasında homojen hafif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Sentrilobuler bölgedeki hepatositlerin sitoplazmasında homojen, granüler ve çok şiddetli immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Safra duktus epitellerinde boyanma (ok), I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x40 objektif, **e:** Az sayıda hepatositte çok şiddetli immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif



Şekil 22: MT, böbrek, **a:** Proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasında segmental ve granüler tarzda boyanma yanında pozitif boyanan bazı epitel hücre çekirdekleri görülmekte (oklar), kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Proksimal tubul epitellerinin sitoplazmasında bazal ve apikal bölgelerde yoğun çizgili tarzda immunopozitif reaksiyon, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Proksimal ve distal tubul epitellerinde sitoplazmik ve nükleer boyanma (oklar), I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 23: MT, bağırsak, **a:** Bağırsaklarda kriptlerin en bazalinde lokalize olan hücrelerde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Daha az sayıda hücrede immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

4.6.4 Zn/Cu SOD

Deneme grupları ile kontrol gruplarındaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularında Zn/Cu SOD antikoru ile yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 5'te gösterilmiştir.

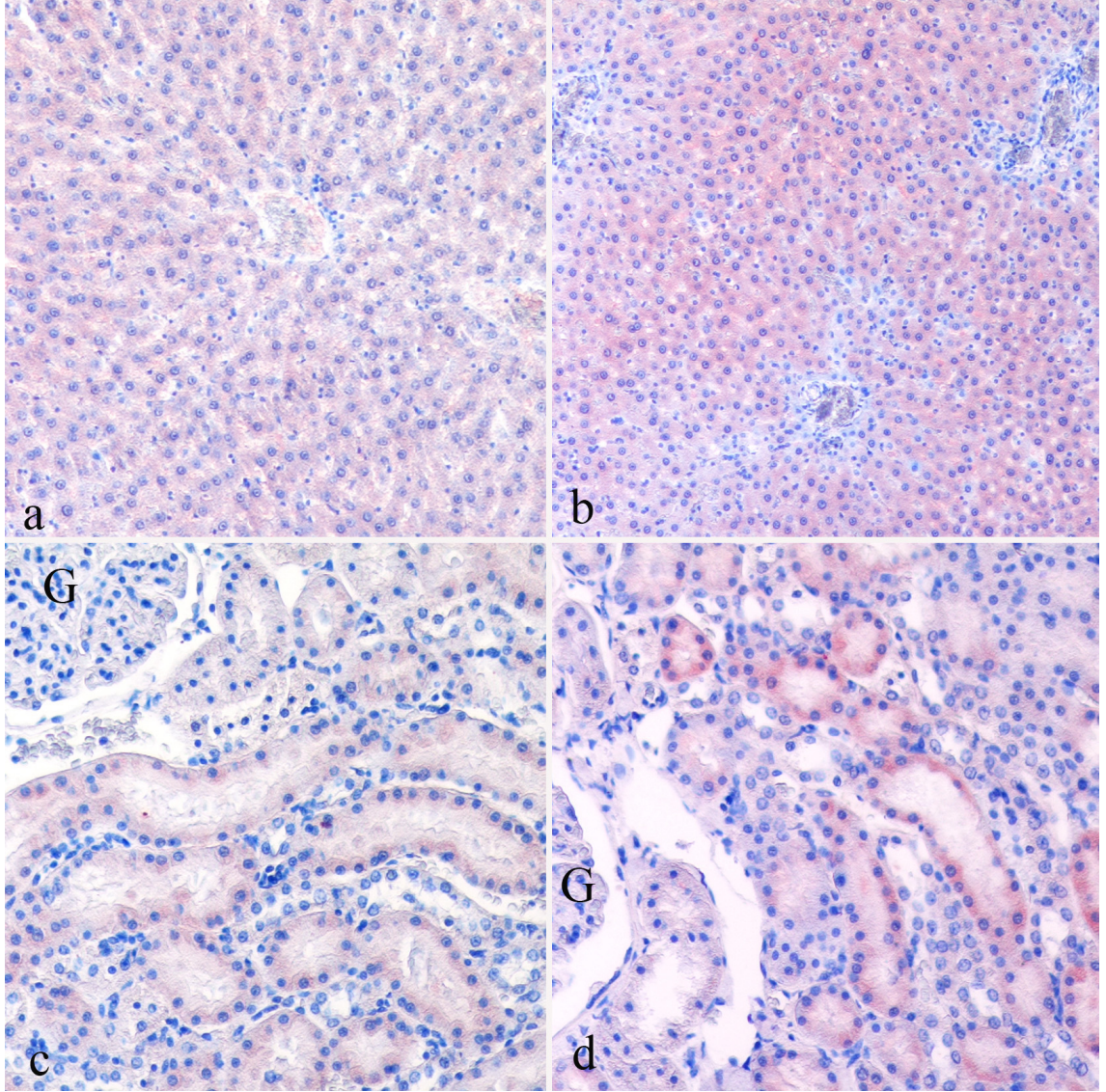
Zn/Cu SOD antikoru ile I. ve II. deneme gruplarındaki ratların karaciğerlerinde bazı hepatositlerin sitoplazmasının homojen karakterde ve diffuz boyandığı, periportal bölgelerde boyanmanın daha az olduğu ve II. deneme grubundaki ratlarda boyanmanın daha hafif şiddette olduğu gözlemlendi. Kontrol gruplarındaki ratlarda hepatositlerin sitoplazmasının ise çok zayıf immunopozitif olduğu dikkati çekti (Şekil 24).

Deneme grupları ile kontrol gruplarındaki ratların böbreklerinde özellikle kortekste bazı proksimal tubul epitellerinin sitoplazması Zn/Cu SOD için immunopozitif. Ancak I. deneme grubu ile kontrol gruplarındaki ratların proksimal tubul epitellerinde II. deneme grubuna göre daha hafif şiddette homojen boyanma dikkati çekti (Şekil 24).

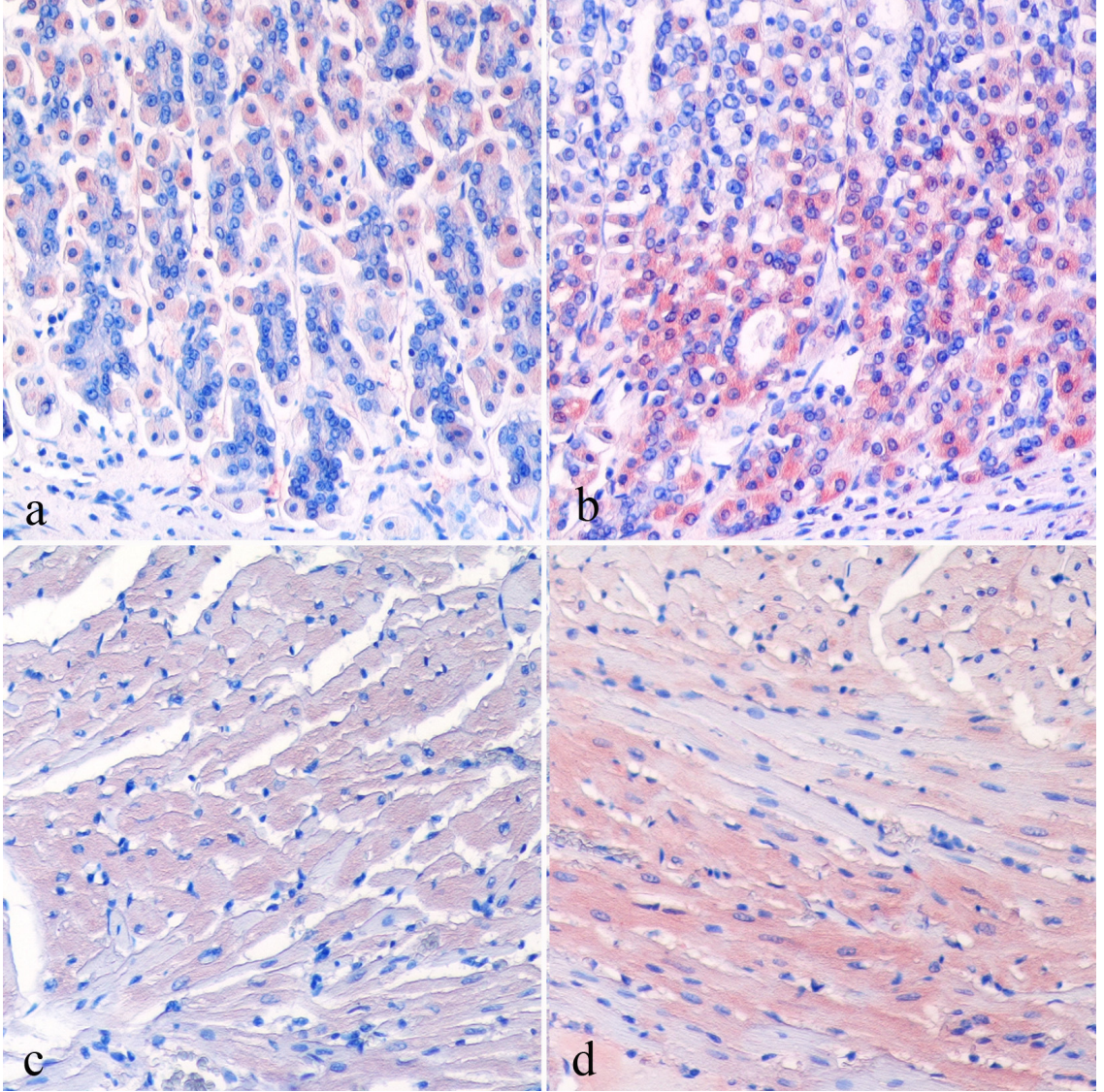
İncelenen tüm gruplardaki ratlarda dalakta özellikle kırmızı pulpa alanlarında Zn/Cu SOD ile pozitif reaksiyon veren hücreler görüldü. II. deneme grubundaki ratlarda boyanan hücre sayısı diğer gruplara göre hem daha az, hem de daha soluk karakterdeydi. Kontrol gruplarında ise kırmızı pulpa alanları dışında subkapsular bölgede de bazı hücrelerin boyandığı ve hücrelerin boyanma yoğunluğunun her iki

deneme grubundan daha şiddetli olduğu gözlemlendi.

Deneme gruplarında midenin glandular bölümünde bazaldeki parietal hücrelerin sitoplazmasının orta şiddette homojen boyandığı dikkati çekti. Kontrol gruplarında ise parietal hücrelerde bazaldan yüzeye doğru boyanma şiddetinin azaldığı görüldü (Şekil 25).



Şekil 24: Cu/Zn SOD, **a:** Hepatositlerin sitoplazmasında hafif homojen immunopozitif boyanma, karaciğer, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Hepatositlerin sitoplazmasında homojen ve diffuz boyanma, karaciğer, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Proksimal tubul epitellerinde çok hafif immunopozitif boyanma, böbrek, kontrol grubu (G; glomerulus), SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Proksimal tubul epitellerinde şiddetli immunopozitif boyanma, böbrek, II. deneme grubu (G; glomerulus), SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 25: Cu/Zn SOD, **a:** Parietal hücrelerinde hafif şiddete immunopozitif boyanma, mide, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Parietal hücrelerde daha şiddetli immunopozitif boyanma, mide, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Kardiyomyositlerde hafif düzeyde boyanma, kalp, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Kardiyomyositlerde şiddetli düzeyde immunopozitif boyanma, kalp, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

Zn/Cu SOD antikoru ile kalp kaslarına yapılan boyamalarda kardiyomyositlerin sitoplazmasının diffuz karakterde boyandığı, deneme gruplarında kontrol gruplarına göre boyanmanın daha şiddetli olduğu dikkati çekti (Şekil 25).

Bağırsak, akciğer, beyin ve beyincik dokuları Zn/Cu SOD antikoru ile boyanmadı.

4.6.5 Kaspaz-9

Deneme ve kontrol gruplarındaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve-beyincik dokularına kaspaz-9 antikoru ile yapılan boyamaların sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir.

I. deneme grubundaki ratların karaciğerinde hepatositlerin sitoplazması hafif şiddette homojen karakterde, bazı olgularda granüler tarzda immunoreaksiyon verdiği görüldü. II. deneme grubunda ise tek tük hücre boyanırken kontrol gruplarında hepatositlerde reaksiyon gözlenmedi (Şekil 26).

I. deneme grubundaki rat böbreklerinin korteks ve kortikomedullar bölgelerinde bazı distal tubul epitellerin sitoplazması kaspaz-9 antikoru ile granüler tarzda boyandı. Ayrıca her iki deneme grubundaki bazı ratlarda böbreklerin interstisyel bölgesinde tek tük kaspaz-9 pozitif hücrelere rastlandı. Kontrol gruplarındaki böbreklerde boyanma olmadı (Şekil 27).

Deneme gruplarındaki olgulara ait dalaklarda özellikle subkapsuler bölgeye yakın kırmızı pulpa alanlarında daha çok, beyaz pulpada ise az sayıdaki lenfoid hücre kaspaz-9 antikoru ile şiddetli immunopozitif reaksiyon verdi. Kontrol gruplarında ise çalışma gruplarıyla aynı bölgelerde ancak daha az sayıdaki hücrede orta şiddette boyanma görüldü.

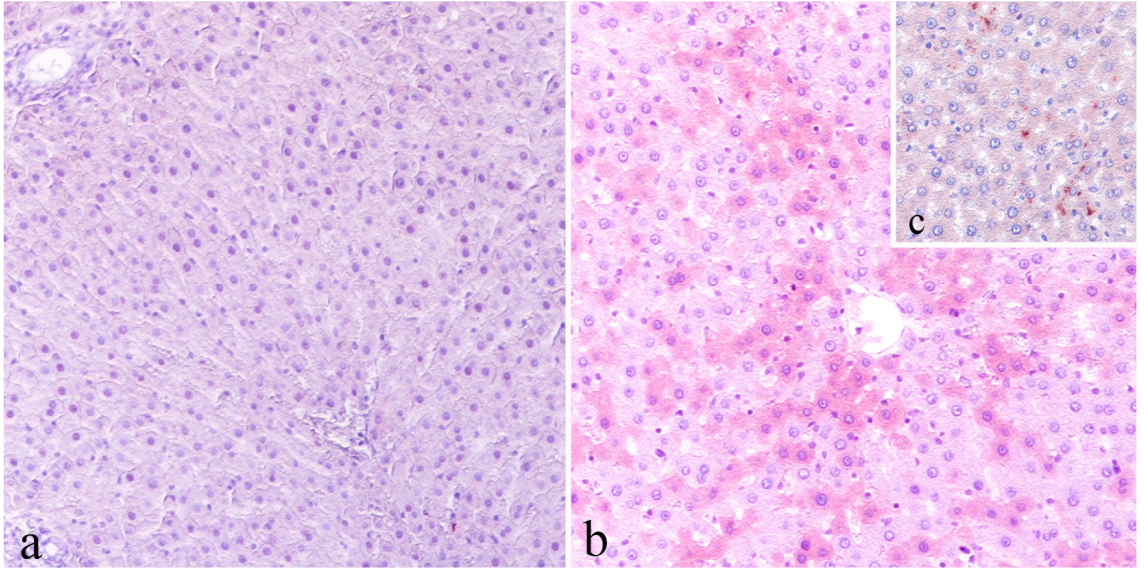
Deneme gruplarındaki ratların midelerinin glandular mukoza bölümünde, özellikle bazale doğru parietal ve prensipal hücrelerde kaspaz-9 için homojen veya yer yer beneklenme tarzında immunoreaksiyon gözlendi (Şekil 28). Her iki deneme grubundaki ratların midelerinin kutan mukozasında subkorneal bölgedeki hücrelerin şiddetli boyandığı görüldü. Deneme gruplarındaki ratların bağırsaklarının duodenum ve ileum bölümlerinde bazaldeki kript epitellerinde, kolonda ise bazı enterositlerin sitoplazmasında çok hafif şiddette pozitif reaksiyon dikkati çekti. Kontrol gruplarının mide ve bağırsaklarında boyanma çalışma gruplarına benzerdi, ancak daha hafif şiddetteydi.

I. deneme grubundaki rat kalplerinde bazı kas tellerinin sitoplazmalarında kaspaz-9 ile hafif homojen boyanma görülürken, deneme ile kontrol gruplarındaki ratların kas telleri arasındaki interstisyel dokuda tek tük immunopozitif hücreler dikkati çekti. Ayrıca damarların media tabakasındaki kas tellerinde de immunopozitif reaksiyon gözlendi (Şekil 28).

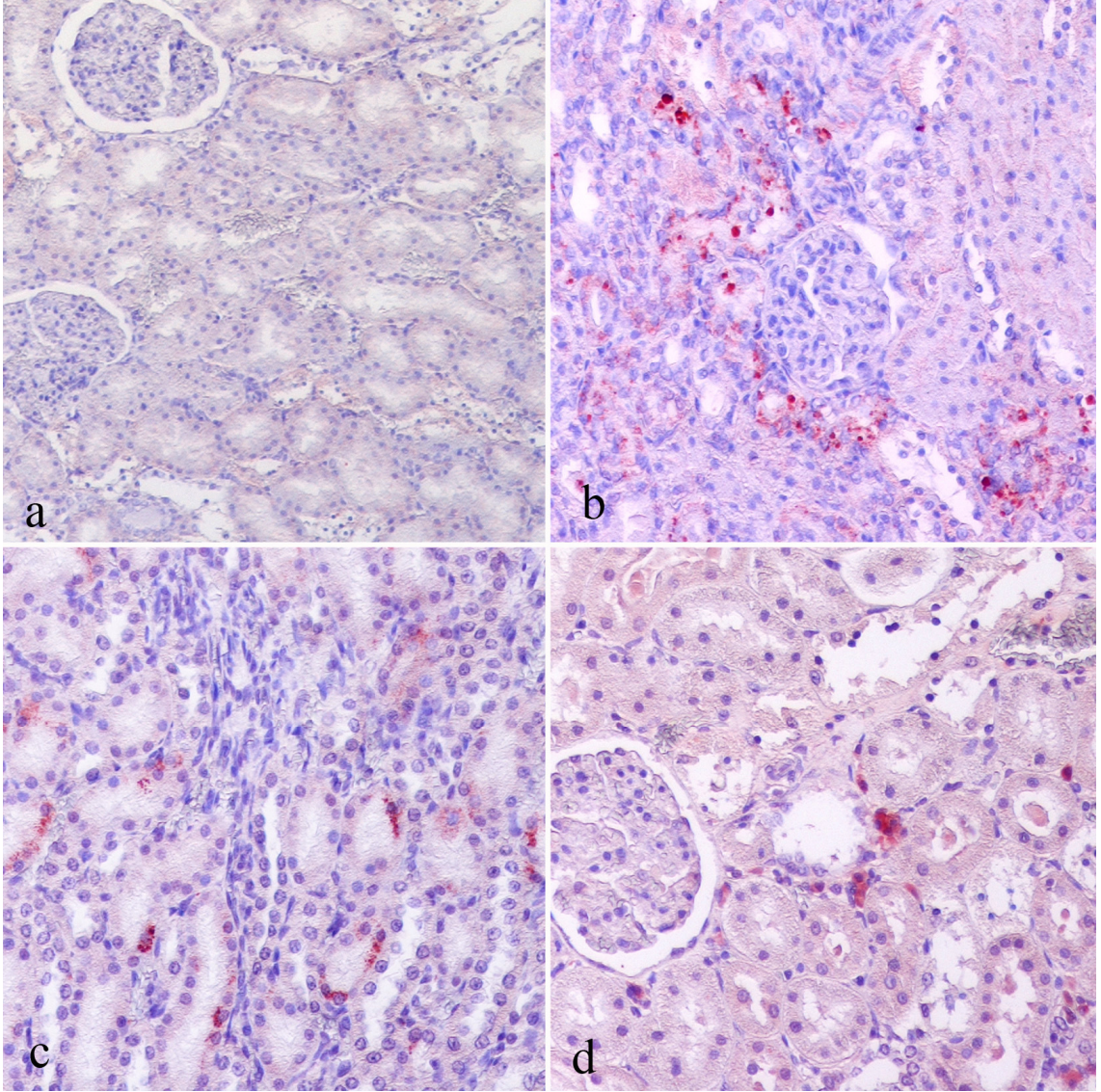
Deneme ve kontrol gruplarına ait akciğer ve beyin dokuları kaspaz-9 antikoru ile boyanmadı, ancak bu dokulardaki damarların media tabakalarında immunopozitif boyanmalar dikkati çekti.

Deneme ve kontrol grubu ratların beyincik dokularında kaspaz-9 antikoru ile yapılan boyamalarda Purkinje hücrelerinde ve serebellar nukleuslardaki bazı nöronların sitoplazmasında orta şiddette immunopozitif reaksiyon gözlemlendi.

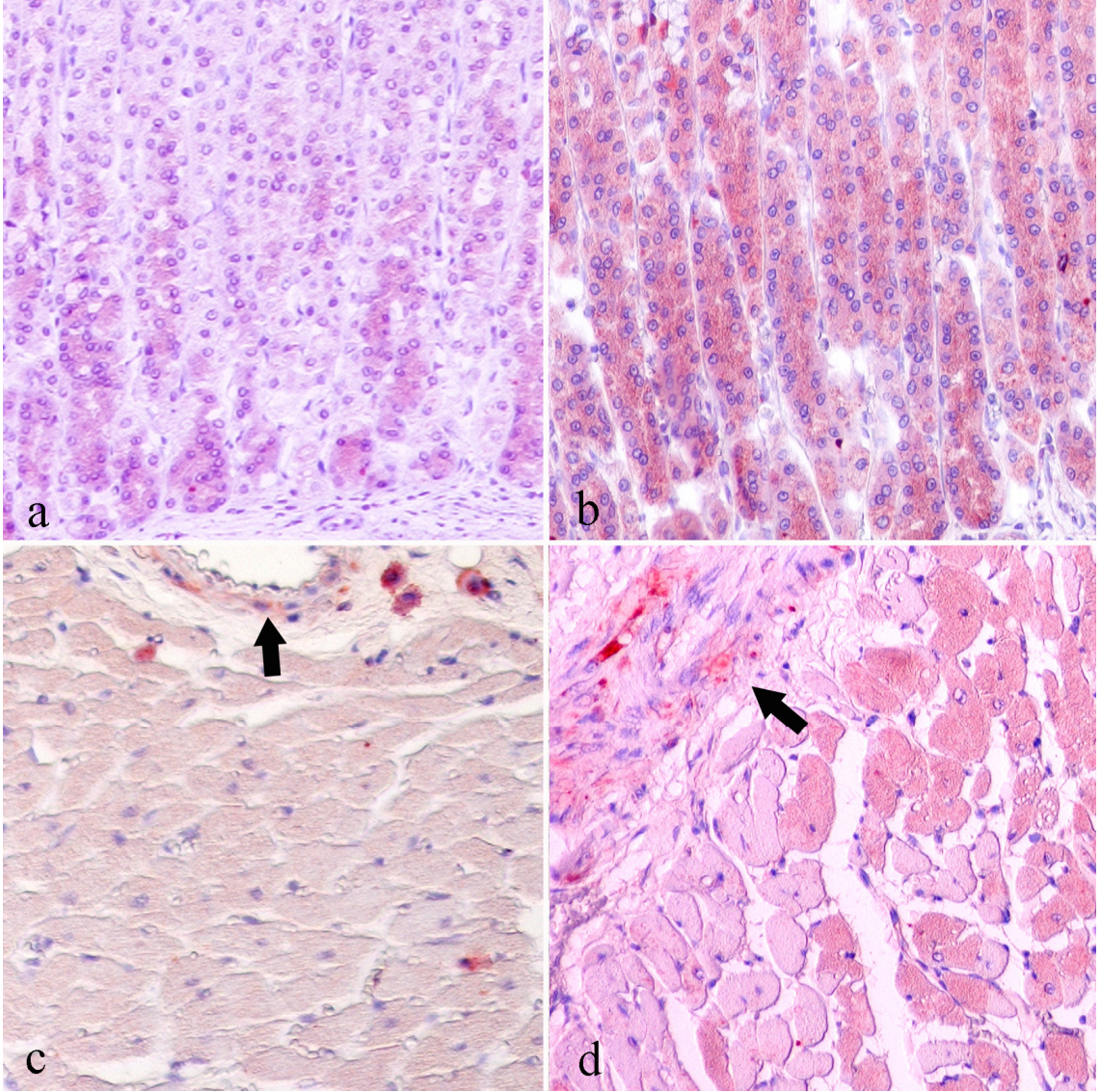
Deneme ve kontrol gruplarına ait karaciğerin portal bölgelerinde, böbrek interstisyumunda ve hilus bölgesindeki yağ hücreleri arasında, mide ve bağırsaklarda propria, submukoza ile musküler katın kas demetleri arasında, akciğerdeki peribronşial ve peribronşiyolar bölgelerde ve kalpte kardiyomiyositlerin arasında lokalize olmuş bazı bağ doku hücrelerinin sitoplazmalarının kaspaz-9 antikoru ile şiddetli immunoreaksiyon verdiği dikkati çekti. Ayrıca tüm doku kesitlerinde musküler arterlerin media tabakasında bulunan düz kas tellerinin de kaspaz-9 antikoru ile boyandığı görüldü.



Şekil 26: Kaspaz-9, karaciğer, **a:** Negatif immun boyanma , Kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Hepatositlerin sitoplazmasında homojen immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Bazı hepatositlerde granüler tarzda boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 27: Kaspaz-9, böbrek, **a:** Negatif immun boyanma, Kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Kortekste tubulus epitellerinde granüler tarzda immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Kortikomedullar bölgede distal tubulus epitellerinde granüler tarzda immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** İnterstisyel dokuda tek tük hücrede immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 28: Kaspaz-9, **a:** Midenin glandular mukozasında parietal ve prensipal hücrelerde orta şiddette immunopozitif boyanma, kontrol grubu, mide, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Midenin glandular mukozasında özellikle bazale doğru parietal ve prensipal hücrelerde şiddetli homojen immunoreaksiyon, I. deneme grubu, mide, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Kalpte kas telleri arasındaki interstisyel dokudaki az sayıdaki hücrede ve damarların media tabakasındaki kas tellerinde (ok) immunopozitif boyanma, kontrol grubu, kalp, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Bazı kardiyomyositlerin sitoplazmasında hafif homojen boyanma, kalp, I. deneme grubu, kalp, SABK metod/AEC, x20 objektif

Tablo 6: Dokulara yapılan immunoperoksidaz testler sonucunda elde edilen bulguların semikalitatif değerleri ve istatistiksel olarak farklılıkları belirten değerler (n=10)

Organlar	Çalışma Grupları	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9	TUNEL
Karaciğer	I. Deneme Grubu	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^b	0 ^b	1 ^b	1 ^b
	Kontrol Grubu	1 ^b	0 ^b	0 ^c	1 ^b
Böbrek	I. Deneme Grubu	2 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
	II. Deneme Grubu	2 ^a	0 ^b	1 ^b	2 ^b
	Kontrol Grubu	1 ^b	0 ^b	0 ^c	1 ^c
Dalak	I. Deneme Grubu	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^b	3 ^a	1 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^a	1 ^b	2 ^b	1 ^a
Mide	I. Deneme Grubu	1 ^a	0 ^a	3 ^a	2 ^b
	II. Deneme Grubu	1 ^a	0 ^a	3 ^a	3 ^a
	Kontrol Grubu	1 ^a	0 ^a	2 ^b	1 ^c
Bağırsak	I. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a
	II. Deneme Grubu	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^b	0 ^b	1 ^b	1 ^b
Kalp	I. Deneme Grubu	2 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^b
	II. Deneme Grubu	2 ^a	1 ^b	1 ^b	2 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Akciğer	I. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^b
	II. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^b
Beyin	I. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a
	II. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^b
Beyincik	I. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	2 ^a	3 ^a
	II. Deneme Grubu	0 ^a	0 ^a	2 ^a	3 ^a
	Kontrol Grubu	0 ^a	0 ^a	2 ^a	2 ^b

a, b, c, aynı harfi taşıyan sütunlarda grup ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0.05$), (Semikalitatif değerler median cinsten elde edilen ortalama değerlerdir)

4.6.6 Kaspaz-8

Deneme grupları ile kontrol grubundaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularında kaspaz-8 antikoru ile yapılan immunoperoksidaz test sonuçları Tablo 6’da gösterilmiştir.

I. deneme grubundaki bazı ratların karaciğerinde hepatositlerin sitoplazmasının kaspaz-8 ile orta şiddette homojen, bazılarının ise granüler tarzda boyandığı görüldü. II. deneme grubu ve kontrol grubundaki ratların karaciğerlerinde ise boyanmaya rastlanmadı (Şekil 29).

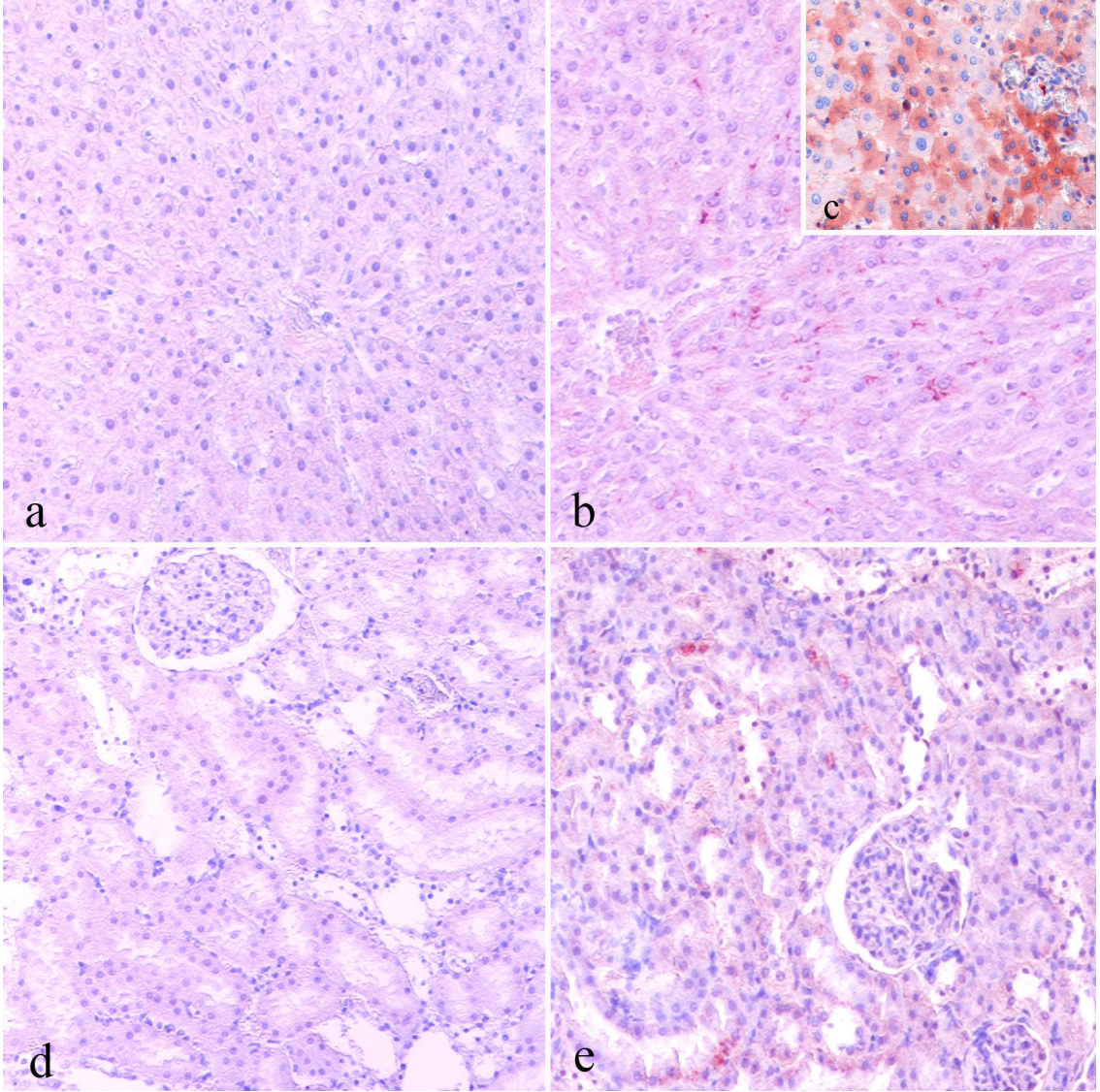
Böbreklere kaspaz-8 antikoru ile yapılan boyamada, I. grup’taki ratlarda kortekste distal ve proksimal tubuluslara ait birkaç epitelin sitoplazması granüler tarzda immunopozitif iken, II. deneme grubu ve kontrol grubundaki böbrek dokularında boyanma görülmedi (Şekil 29). Çalışma ve kontrol gruplarına ait böbrek kesitlerinde hilus bölgesinde yağ hücreleri arasında sitoplazması kaspaz-8 antikoru ile yoğun boyanan hücrelere rastlandı.

I. deneme grubundaki ratlara ait dalakların genelde kırmızı pulpa alanlarında kaspaz-8 antikoru ile sitoplazması yoğun boyanmış lenfoid hücreler görüldü. II. deneme grubu ve kontrol gruplarındaki dalaklarda ise daha az sayıdaki lenfoid hücrenin sitoplazmasının çok hafif şiddette immunopozitif olduğu dikkati çekti.

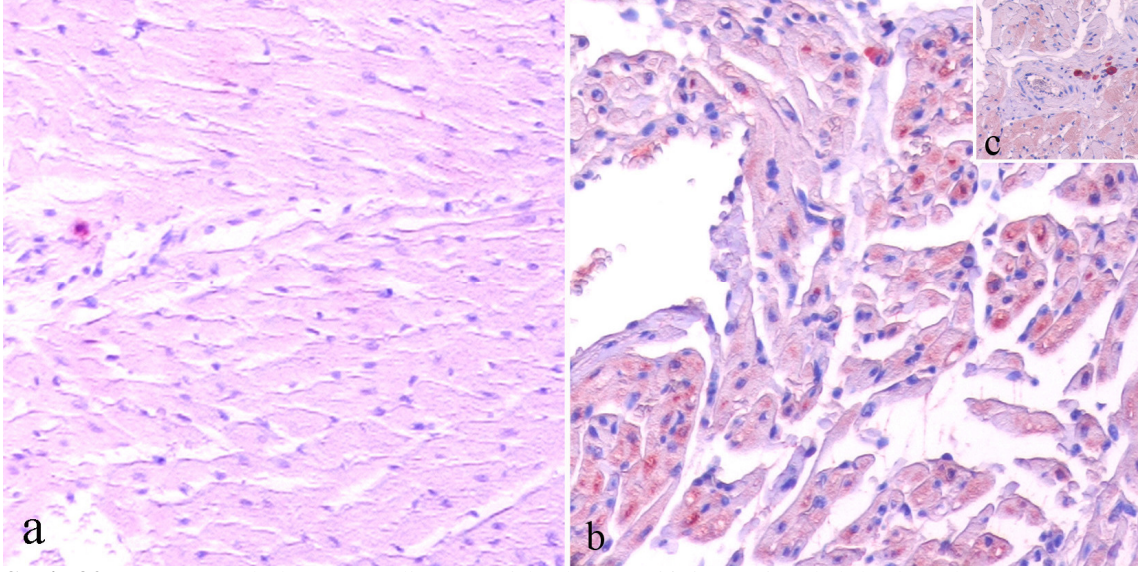
Deneme ve kontrol gruplarında mideler kaspaz-8 antikoru ile immunoreaksiyon vermedi. Deneme gruplarına ait bağırsaklarda sadece kriptlerin en bazalindeki hücrelerin pozitif boyandığı, ancak II. deneme grubunda I. deneme grubuna göre daha az sayıda hücrenin boyandığı görüldü. Kontrol gruplarına ait bağırsaklarda kaspaz-8 antikoru ile boyanma olmadı.

I. ve II. deneme grubu ratların kalp kası tellerinin sitoplazması bazı olgularda homojen bazılarında granüler karakterde hafif şiddette boyandı. II. deneme grubunda boyanan hücre sayısının daha az olduğu dikkati çekti. Kontrol gruplarında ise kardiyomiyositlerde boyanmaya rastlanmadı. Deneme ve kontrol gruplarına ait tüm kalp kesitlerinde interstisyel bölgede bazı hücrelerin sitoplazmasının çok şiddetli immunopozitif boyandığı görüldü (Şekil 30).

Deneme ve kontrol gruplarında akciğer, beyin ve beyincik dokularında kaspaz-8 antikoru ile boyanma olmadı.



Şekil 29: Kaspaz-8, **a:** Negatif immun boyanma, kontrol grubu, karaciğer, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Bazı hepatositlerde granüler tarzda immunopozitif boyanma, karaciğer, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Bazı hepatositlerde homojen ve şiddetli immunopozitif boyanma, karaciğer, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Negatif immun boyanma, kontrol grubu, böbrek, SABK metod/AEC, x10 objektif, **e:** Bazı tubulus epitellerinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, böbrek, SABK metod/AEC, x10 objektif



Şekil 30: Kaspaz-8, kalp, **a:** Kardiyomyositlerde negatif, interstisyel dokuda çok az sayıda bağ doku hücrelerinde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Kardiyomyositlerde granüler tarzda immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** İnterstisyel dokuda bağ doku hücrelerinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

4.6.7 Kaspaz-3

Deneme grupları ve kontrol gruplarındaki ratlarda karaciğer, böbrek, dalak, mide- bağırsak, kalp, akciğer, beyin-beyincik dokularında kaspaz-3 antikoruna ile yapılan boyamadan elde edilen sonuçlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

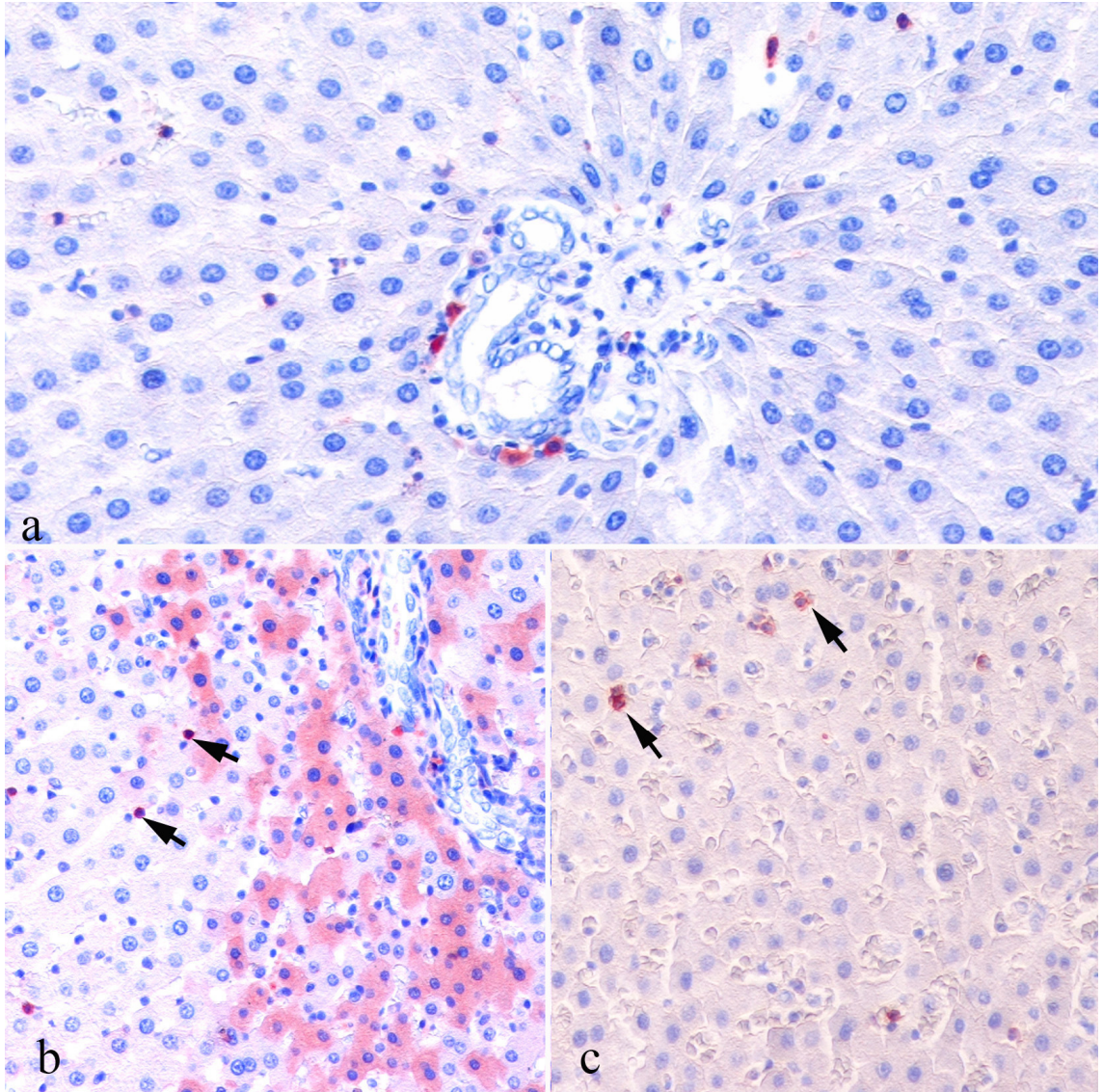
I. deneme grubundaki bazı ratların karaciğerinde tek tük, bazılarında ise daha fazla sayıda hepatositin sitoplazmasında kaspaz-3 için immunopozitif boyanma görüldü. Ayrıca hepatositler arasında lokalize olan bazı apoptotik görünümlü hücrelerin (muhtemelen Kupffer hücreleri) sitoplazmasının da şiddetli boyandığı dikkati çekti. II. deneme grubundaki ratların karaciğerinde hepatositlerde boyanma gözlenmezken, hepatositlerin arasında apoptotik görünümlü bazı sinüzoidal hücrelerde şiddetli boyanma görüldü. Kontrol grubundaki ratlara ait hepatositlerde boyanma olmadı, ancak portal alanlarda sitoplazması pozitif boyanan hücrelere rastlandı (Şekil 31).

Deneme gruplarındaki ratların konvolut proksimal ve distal tubuluslarında az sayıda epitelin sitoplazması granüler tarzda immunoreaksiyon verdi. Ayrıca I. deneme grubundaki bazı ratlarda Henle kulpu epitellerinde hafif pozitif boyanma dikkati çekti. Kontrol gruplarındaki böbreklerde ise çok az sayıdaki tubulus epitelinde immunopozitif boyanma gözlemlendi (Şekil 32).

Deneme ve kontrol gruplarındaki ratlara ait dalakların kırmızı pulpa alanlarında

tek tük lenfoid hücrelerin kaspaz-3 antikoru ile immunopozitif reaksiyon verdiği görüldü.

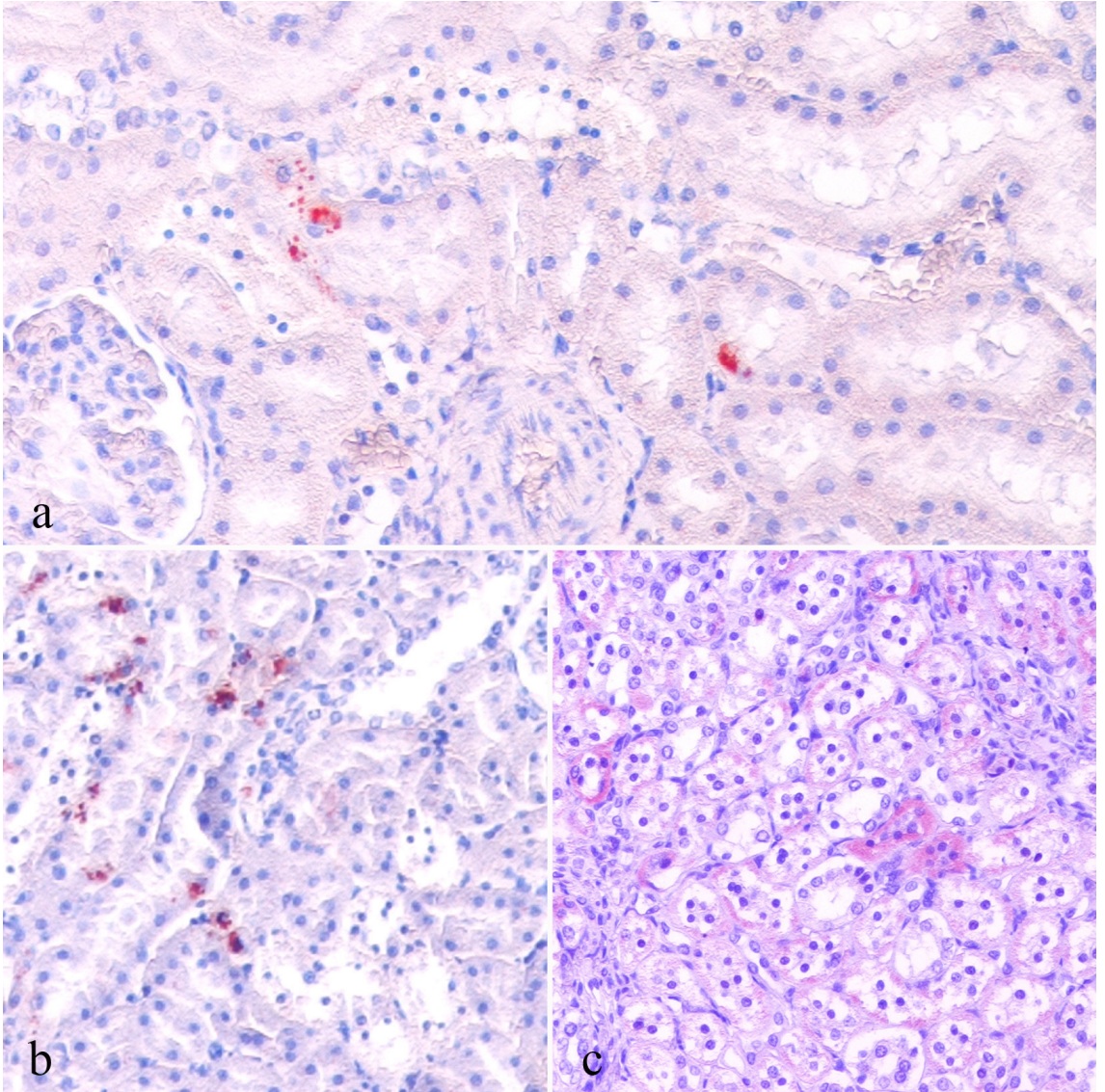
Hem deneme hem de kontrol gruplarındaki ratların midelerinin glandular mukozasında, bazı bez hücrelerinin sitoplazmasında hafif şiddette granüler tarzda boyanma belirlendi. Deneme gruplarının ileumunda az sayıda kript epiteli kaspaz-3 antikoru ile boyanırken, duodenumda reaksiyon gözlenmedi. Kontrol grubuna ait bağırsaklarda boyanmaya rastlanmadı (Şekil 33).



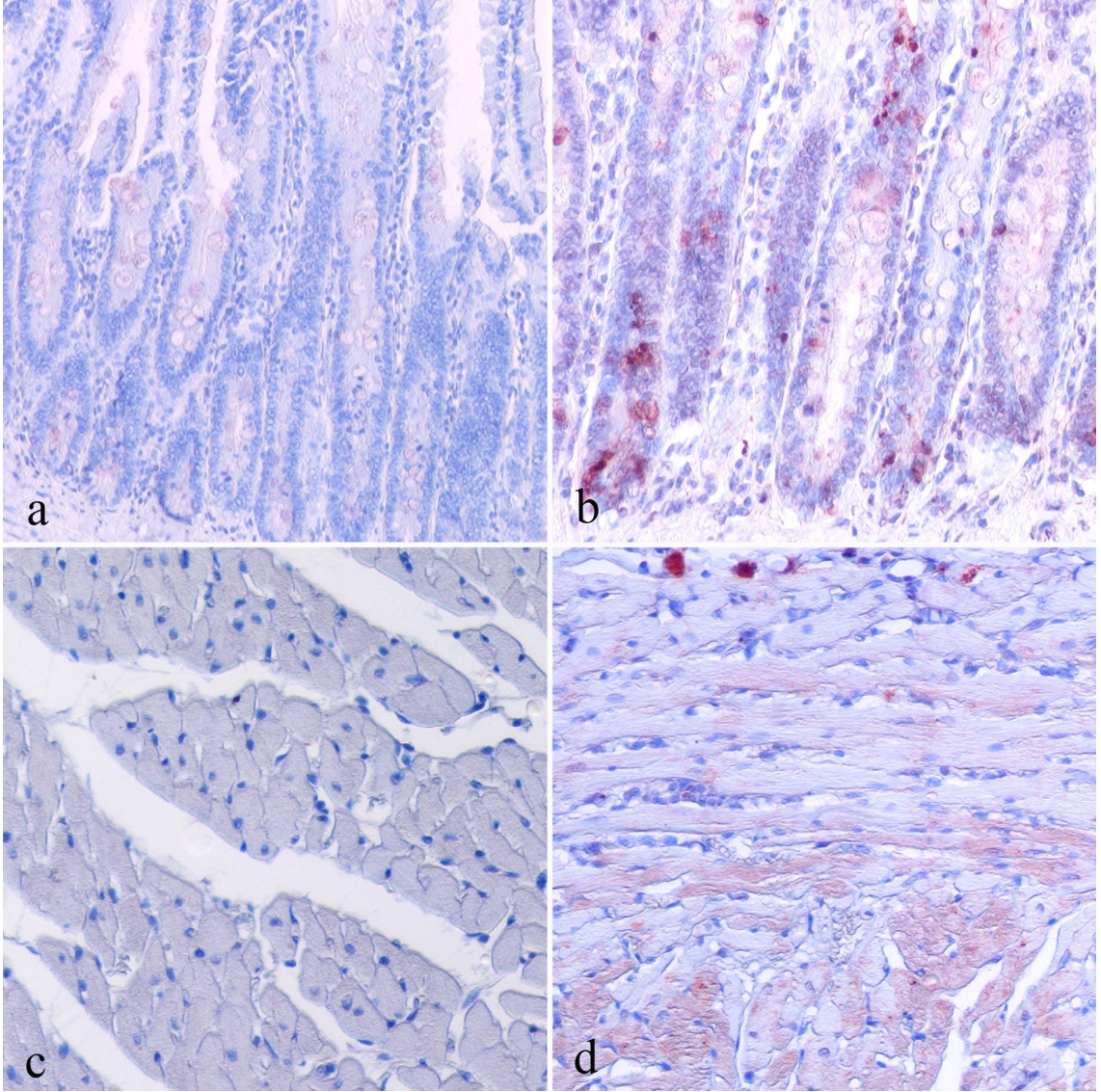
Şekil 31: Kaspaz-3, karaciğer, **a:** Hepatositlerde negatif, bazı interstisyel hücrelerde pozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Bazı hepatositlerde ve apoptotik görünümlü bazı perisinüzoidal hücrelerde (oklar) immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Hepatositlerde negatif, apoptotik görünümlü bazı perisinüzoidal hücrelerde (oklar) immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

Deneme gruplarındaki olgularda bazı kardiyomyositlerin ve interstisyel dokudaki bazı bağ doku hücrelerinin sitoplazması kaspaz-3 antikoru ile homojen karakterde immunopozitif boyanma gösterdi. Ancak II. deneme grubundaki boyanmanın daha hafif şiddette olduğu gözlemlendi. Kontrol gruplarında boyanmaya rastlanmadı (Şekil 33).

Akciğer, beyin ve beyincik dokularında kaspaz-3 antikoru ile immunoreaksiyon gözlenmedi.



Şekil 32: Kaspaz-3, böbrek, **a:** Az sayıdaki tubulus epitelinde immunopozitif boyanma, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **b:** Bazı konvolüt proksimal ve distal tubuluslarda granüler tarzda immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **c:** Medullada dejenere Henle kulpu hücrelerinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif



Şekil 33: Kaspaz-3, **a:** Negatif immun boyanma, bağırsak, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **b:** Bazı kript epitellerinde yoğun immunopozitif boyanma, bağırsak, II. deneme grubu, SABK metod/AEC, x10 objektif, **c:** Negatif immun boyanma, kalp, kontrol grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif, **d:** Kardiyomyositlerin sitoplazmasında hafif şiddette, interstisyel dokudaki bazı bağ doku hücrelerinde şiddetli immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, SABK metod/AEC, x20 objektif

4.6.8 TUNEL metodu ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi

Deneme ve kontrol gruplarındaki ratların karaciğer, böbrek, dalak, mide-bağırsak, kalp, akciğer, beyin ve beyincik dokularına ait TUNEL test sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir.

I. deneme grubunda II. deneme grubuna göre daha çok sayıda hepatosit çekirdeğinde immunopozitif reaksiyon görüldü. I. deneme grubunda bazı safra kanalı epitellerinin çekirdeğinin de pozitif boyandığı dikkati çekti (Şekil 34-c). Kontrol

gruplarında ise bazı ratlarda tek tük, bazılarında ise daha fazla sayıda hepatosit immunopozitif olduğu görüldü (Şekil 34).

Deneme gruplarında kortekste özellikle distal daha az sayıda proksimal tubul epitellerinin, ayrıca medullada bazı Henle kulpu epitellerinin çekirdeğinin pozitif boyandığı görüldü. II. deneme grubunda boyanan hücre sayısının I. deneme grubuna göre daha az olduğu dikkati çekti. Kontrol gruplarında ise kortekste çalışma gruplarına göre daha az sayıda distal ve proksimal tubul epitelleri boyandı. Hem deneme hem de kontrol gruplarındaki ratlarda glomerular yumak içerisinde bazı hücrelerin immunopozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 35).

Deneme ve kontrol grubundaki ratların dalaklarına uygulanan TUNEL metodu sonucunda tek tük pozitif boyanan hücrelere rastlandı, ancak gruplar arasında önemli bir farklılık yoktu.

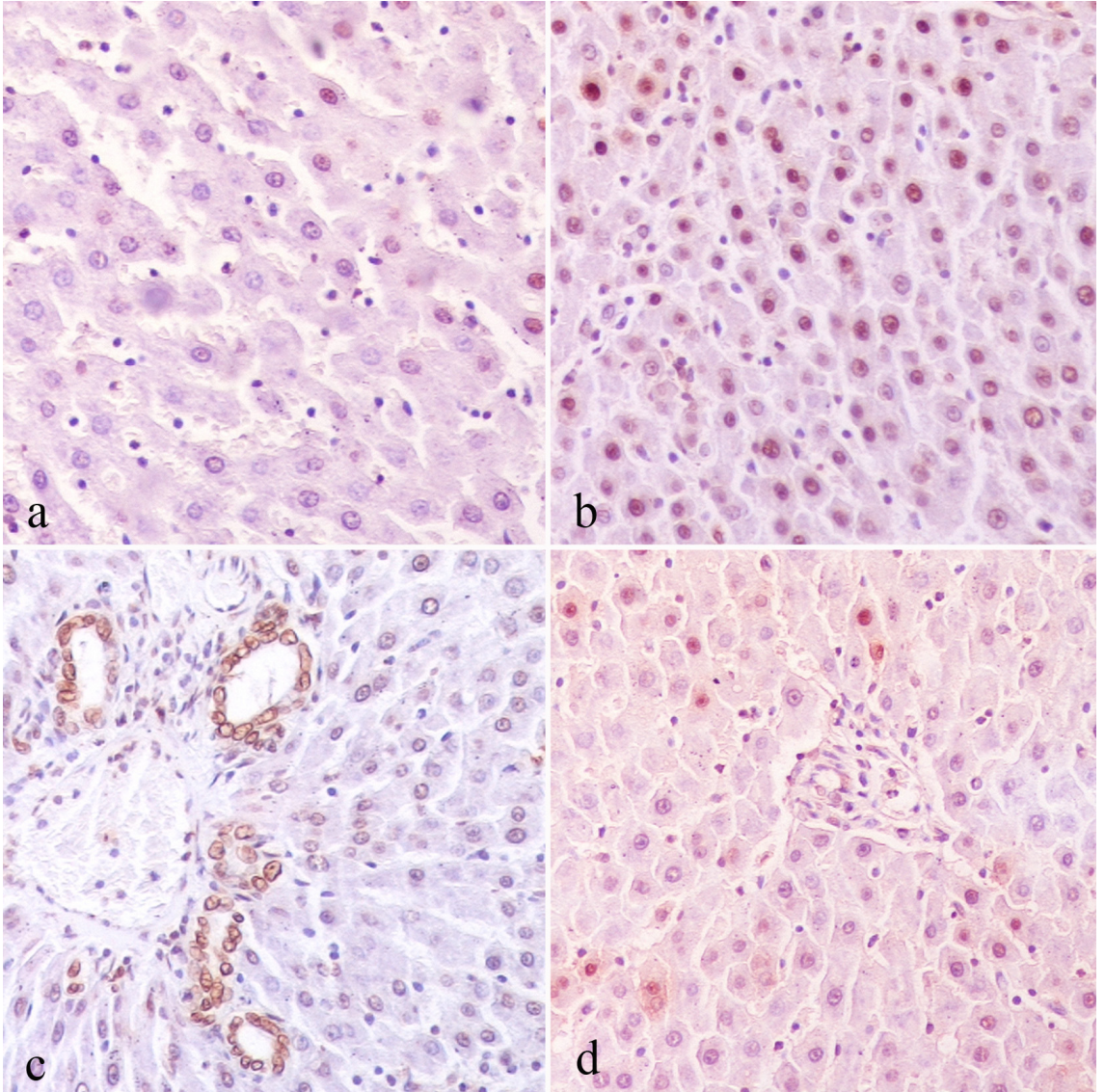
Deneme gruplarına ait ratların kalp kası tellerinde TUNEL metodu ile pozitif boyanma gözlemlendi. Ancak II. deneme grubunda pozitif boyanan hücre sayısının I. deneme grubuna göre arttığı belirlendi. Kontrol gruplarında bazı kardiomyosit çekirdeklerinin de pozitif boyandığı gözlemlendi (Şekil 35).

Deneme gruplarındaki ratların midelerinin kutan mukazasında hiperkeratotik üst tabakanın altındaki hücrelerde kontrol gruplarına göre daha çok sayıda hücrenin çekirdeğinin boyandığı dikkati çekti. Deneme gruplarına ait ratların midelerinin glandular mukazasında genelde bazale yakın parietal ve prensipal hücrelerin TUNEL pozitif oldukları görüldü. Pozitif hücre sayısının II. deneme grubunda I. deneme grubuna göre artış gösterdiği, kontrol gruplarında ise boyanan hücre sayısının çalışma gruplarına göre daha az olduğu dikkati çekti (Şekil 36). Bağırsakların duodenum, ileum ve kolon bölümlerinde kontrol gruplarında bağırsak kriptlerinde tek tük TUNEL pozitif hücrelere rastlanırken, çalışma gruplarında kontrol gruplarındaki bulgulara ilave olarak çok sayıda enterositte pozitiflik dikkati çekti (Şekil 36).

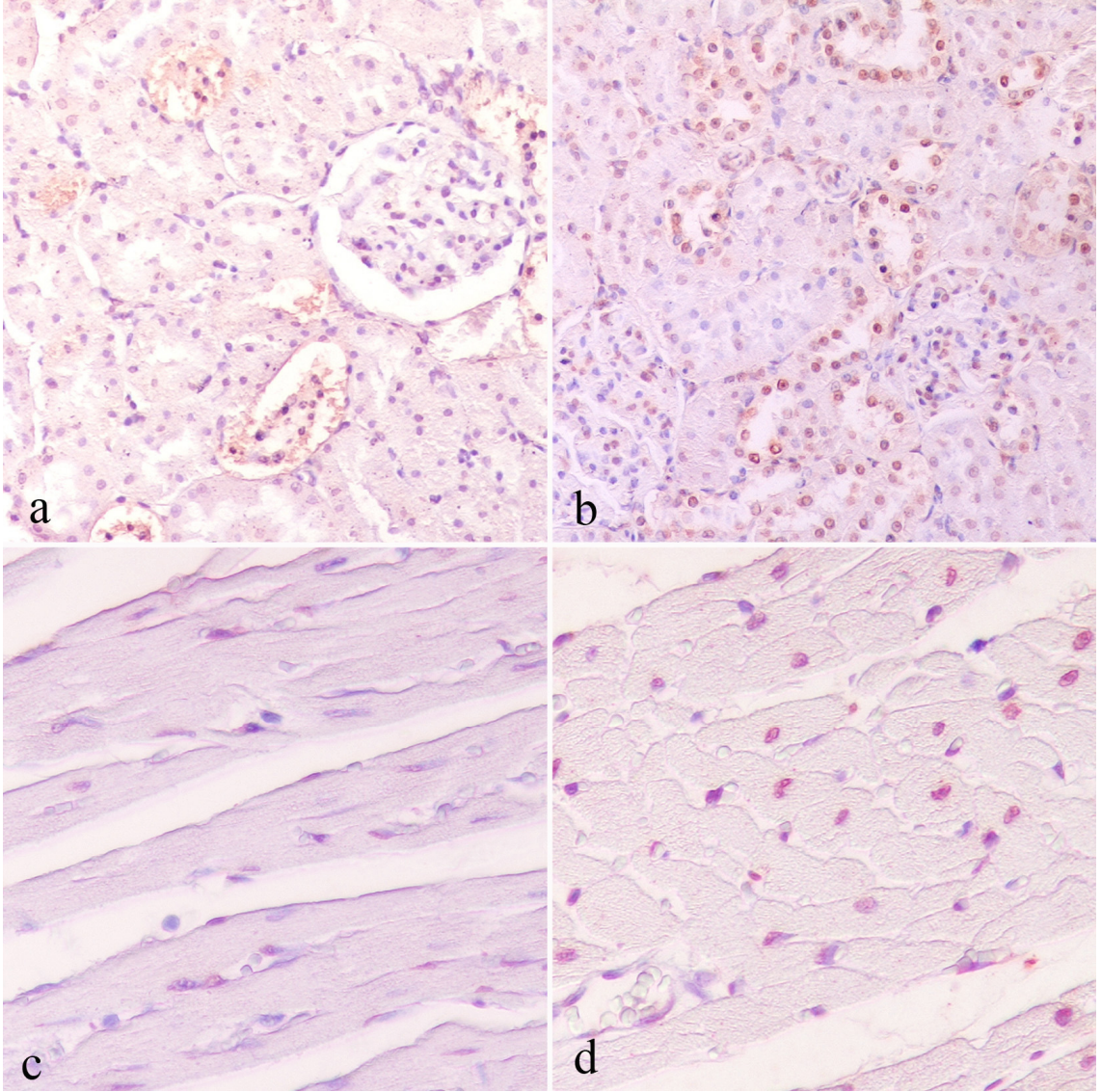
I. deneme grubu ve kontrol gruplarındaki ratlara ait akciğer kesitlerinde pozitif hücrelere rastlanmazken, II. deneme grubundaki ratlarda sıklıkla karşılaşılan interstisyel pnömoni nedeniyle peribronşial ve interalveolar septal dokularda bazı mononükleer hücrelerin, alveol lümenini döşeyen epitellerin TUNEL pozitif boyandıkları dikkati çekti.

Deneme gruplarına ait bazı ratlarda beyin zarlarının, koroid pleksusun,

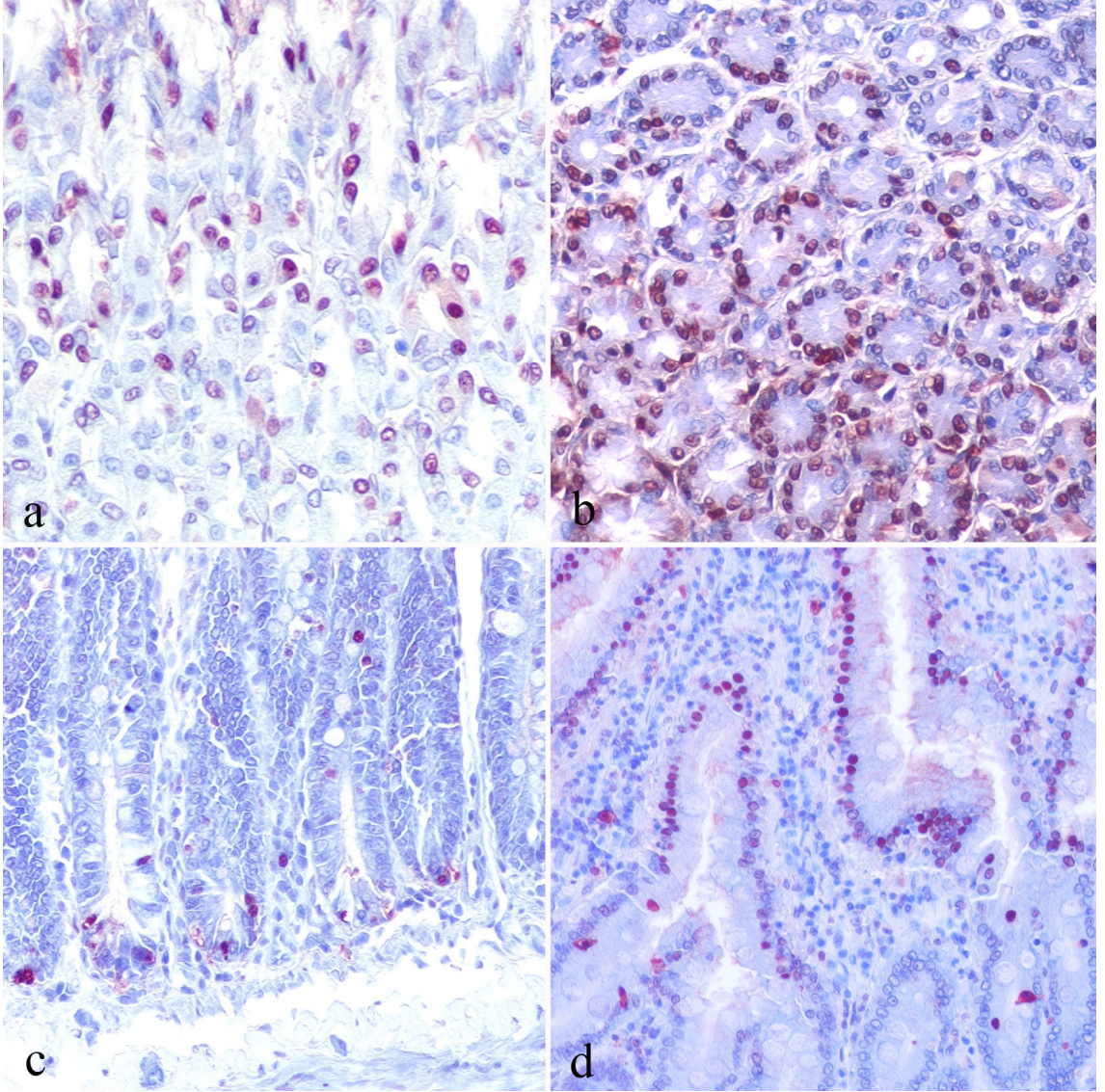
ependim hücrelerinin, subependimal hücrelerin ve yer yer glia hücrelerinin TUNEL pozitif oldukları dikkati çekti. Kontrol gruplarında ise az sayıda glia hücrelerinin TUNEL pozitif olduğu gözlemlendi. Hem deneme hem de kontrol gruplarındaki ratların beyinciklerinde granülozum tabakası hücrelerinin immunopozitif olduğu, ayrıca deneme gruplarındaki ratların molekülare katındaki glia hücrelerinin de pozitif boyandığı dikkati çekti (Şekil 37).



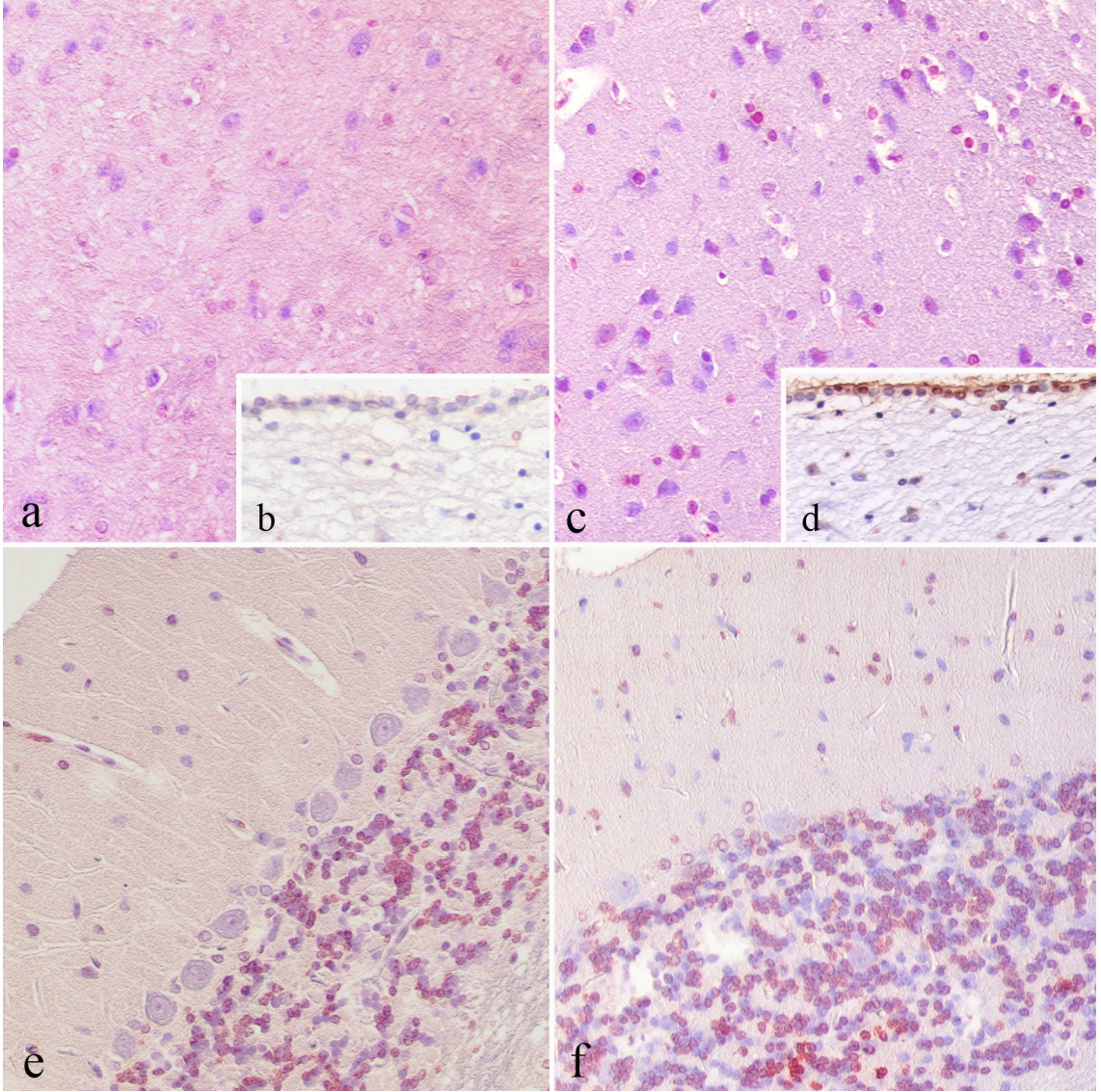
Şekil 34: TUNEL metot, karaciğer, **a:** Az sayıda hepatosit çekirdeğinde pozitif boyanma, kontrol grubu, DAB, x20 objektif, **b:** Bazı hepatosit çekirdeklerinde immunopozitif boyanma, I.deneme grubu, AEC, x20 objektif, **c:** Duktus biliiferi epitellerinin çekirdeğinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, DAB, x20 objektif, **d:** Az sayıda hepatosit çekirdeğinde immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, AEC, x20 objektif



Şekil 35: TUNEL metot, **a:** Böbrekte az sayıda distal ve proksimal tubul epiteli çekirdeğinde pozitif boyanma, kontrol grubu, DAB, x10 objektif, **b:** Böbrek distal ve proksimal tubul epitel çekirdeğinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, DAB, x10 objektif, **c:** Kalpte bazı kardiyomyositlerin çekirdeğinde pozitif boyanma, kontrol grubu, AEC, x20 objektif, **d:** Kalpte çok sayıda kardiyomyosit çekirdeğinde immunopozitif boyanma, II. deneme grubu, AEC, x20 objektif



Şekil 36: TUNEL metot, **a:** Mide bez epitellerinin çekirdeğinde pozitif boyanma, kontrol grubu, AEC, x20 objektif, **b:** Çok sayıda mide bez epitelinin çekirdeğinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, AEC, x20 objektif, **c:** Bağırsakta çok az sayıda kript epitelinin çekirdeğinde pozitif boyanma, kontrol grubu, AEC, x20 objektif, **d:** Bağırsakta çok sayıda enterosit çekirdeğinde immunopozitif boyanma, I. deneme grubu, AEC, x20 objektif



Şekil 37: TUNEL, **a:** Beyinde glia hücrelerinde hafif pozitif boyanma, kontrol grubu, AEC, x20 objektif, **b:** Ependim hücreleri TUNEL negatif, kontrol grubu, AEC, x40 objektif, **c:** Beyinde çok sayıda glia hücrelerinde pozitif boyanma, I. deneme grubu, AEC, x20 objektif, **d:** Ependim hücreleri TUNEL pozitif, II. deneme grubu, AEC, x40 objektif, **e:** Serebellumda granülozum tabakasında çok sayıda TUNEL pozitif hücre, kontrol grubu, AEC, x20 objektif, **f:** Serebellumda granülozum ve moleküler tabakalarında çok sayıda TUNEL pozitif glia hücreleri, I. deneme grubu, AEC, x20 objektif

5. TARTIŞMA

Bakır, memelilerin dokularında birikebilen ve dokulardaki konsantrasyonları kritik değerlere ulaştığında toksik etkiler gösterebilen bir metaldir. Bu metale maruz kalındığında başta karaciğer ve böbrek olmak üzere, pek çok dokuda patolojik değişiklikler geliştiği bildirilmektedir (Harris, 2003; Lutsenko ve ark., 2007).

Sunulan çalışmada bakıra maruz bırakılan her iki deney grubunun serum bakır konsantrasyonu, kontrol gruplarının serum bakır konsantrasyonuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi. I. deneme grubundaki ratların serum bakır konsantrasyonunun II. deneme grubundakilere göre yüksek olmasını, Fuentealba ve ark. (1987) ve Haywood ve ark. (1985)'nin hipotezlerinde belirttiği gibi, bakırın karaciğerde farklı hücresel organellerde biriktikten sonra oluşan doygunluğun ardından, bakırın taşıyıcı proteinlere bağlanarak kana verilmesi ve böbrekler üzerinden atılması ile açıklanabilir. Ayrıca Harada ve ark. (1993) bakırın safrayla atılmaya başlamasının ardından safradaki konsantrasyonunun plazmadakinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Karaciğer bakır metabolizmasının gerçekleştiği organdır. Bu nedenle bakırın en önemli hedef organının karaciğer, daha sonra da böbrek olduğu bildirilmiştir (Linder ve Hazegh-Azam; 1996). Haywood ve ark. (1985) ratlarda oral yolla bakır zehirlenmesi oluşturarak haftalara göre dokulardaki bakır birikimini rodanın boyama tekniği ile göstermişlerdir. Araştırmacılar ikinci haftadan itibaren karaciğerde bakırın lizozom, çekirdek ve çekirdekçikte birikmeye başladığını, uygulamanın dördüncü haftasında ise bakır birikiminin ikinci haftadan daha yüksek olmadığını belirtmişlerdir. Sunulan çalışmadaki bulgular, Haywood ve ark. (1985)'nin bildirdiklerine benzer olarak dört hafta bakır verilen II. deneme grubundaki ratların karaciğerlerinde bakır birikiminin I. deneme grubundan daha az yoğunlukta olduğu izlendi. Bakırın rodanın boyası ile karaciğerin tüm lobcukları ve hepatositlerinde (Haywood ve ark., 1985, Harada ve ark., 1993) ya da midzonal bölge ve periportal bölgelerde (Fuentealba ve ark., 2000; Roy ve ark., 2009) granüler yapıda boyandığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada bakırın karaciğerin tüm lobcuklarında ve tüm hepatositlerinde (I. deneme grubu olgu no: 1,2,6,7,8, 9,10,12,13), periportal bölgelerdeki hepatositlerde yoğunluğu artmış olarak (I. deneme grubu olgu no: 11,14) boyanması, bahsedilen literatüre (Haywood ve ark., 1985; Harada

ve ark., 1993; Fuentealba ve ark., 2000) benzerdi. Özellikle II. deneme grubundaki ratlarda (olgu no: 2,3,4,6,7 ve 10) lopçuk içerisinde dağınık hücre kümeleri şeklinde ya da lopçuk içerisinde tek tük hücreler (I. deneme grubu olgu no: 4,5 ve II. deneme grubu olgu no: 1,6,8,9,11,12,13,14) tarzında boyandığı gözlemlendi. Rodanin ile bakırın safra kanalikulusları boyunca, daha az miktarda da hepatositlerin sitoplazmasında granüler tarzda bulunduğu dikkati çekti. Bakırın hepatosit çekirdeğinde de biriktiği bilinmesine rağmen, bu çalışmada rodanin boyası ile çekirdekte bakırın gösterilememiş olması, Fuentealba ve ark. (1987)'nin bildirdikleri ile uyumlu bulundu. Bu çalışmada gruplar içinde hepatositlerdeki bakırın rodanin tekniği ile boyanma tarzında ve yoğunluğunda gözlenen farklılıkların, ratların bireysel özelliklerden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

Bakırın genel olarak Kupffer hücreleri ve sinüzoidal hücrelerde boyanmaması Harada ve ark., (1993)'ın bildirdikleri ile uyumludur. Ancak hepatositlerde bakırın en yoğun olarak boyandığı bir olguda (I. deneme grubu, olgu no: 7) bazı Kupffer hücre sitoplazmasının da rodanin pozitif olduğu dikkati çekti.

Bakırın vücuttan atılımında ikinci derecede önemli olan organ böbrektir. Bakır böbrekte proksimal tubulus epitellerinin lizozom ve çekirdeklerinde birikmektedir (Fuentealba ve ark., 1987). Haywood ve ark. (1985) bakır zehirlenmesinin ikinci haftasından itibaren rodanin boyası ile bakırın proksimal konvolut tubul lümeni ve epitellerinin sitoplazmasında granüler yapıda varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada I. deneme grubundan sadece 3 olguda (olgu no: 4,7,13), II. deneme grubundan ise 5 olguda (olgu no: 3,5,11,12 ve 13) benzer bulgulara rastlandı. II. deneme grubunda daha fazla sayıda olguda boyanmanın görülmesinin nedeni; bir çok çalışmada (Haywood ve ark., 1985; Fuentealba ve ark., 1987; Fuentealba ve ark., 1989; Fuentealba ve ark., 1993; Bremner, 1998; Aburto ve ark., 2001; Gerberding, 2004) ifade edildiği gibi, bakırın hepatositlerin çekirdek ve lizozomlarında biriktikten sonra hepatositlerin hasar görmesi sonucu serbest kalan bakırın kana geçerek filtrasyon sırasında böbrek tubulleri tarafında resorbe edilmesi ile açıklanabilir.

Bakır zehirlenmesinde karaciğerin mikroskopik incelemesinde gözlenen lezyonlar spesifik değildir. Bunlar, hepatositlerde vakuoler dejenerasyon ve anizokaryozis (Ke ve ark., 2008), hepatosit çekirdeklerinde piknozis ve karyoreksisle kendini gösteren tek hücre nekrozu (Haywood ve ark., 1985; Bremner, 1998; Aburto ve

ark., 2001), apoptotik cisimlerin oluşması (Bremner, 1998), Kupffer hücresi (Aburto ve ark., 2001) ve hepatositlerin sitoplazmasında hyalin kalıntıları (Fuentealba ve ark., 2000; Aburto ve ark., 2001), Kupffer hücrelerinin ya da hepatositlerin sitoplazmasında Mallory cisimciğine benzer yapıların oluşması (Bremner, 1998; Roy ve ark., 2009), periportal bölgelerde lenfositlerin çoğunlukta bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonu (Fuentealba ve ark., 2000; Aburto ve ark., 2001; Gerberding, 2004; Ke ve ark., 2008), portal bölgelerde hafif fibrozis (Ke ve ark., 2008; Roy ve ark., 2009), çevresi çoğunlukla makrofaj daha az miktarda nötrofil ve lenfosit ile kuşatılmış küçük nekrotik odaklar (Fuentealba ve ark., 2000; Aburto ve ark., 2001) ve safra kanallarında proliferasyon (Roy ve ark., 2009) olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada yukarıda bahsedilen literatürde belirtilen benzer histopatolojik bulgulara rastlanmıştır. Histopatolojik bulgular açısından her iki deneme grubu arasında farklılıklar gözlenmiştir. Karaciğerin portal bölgelerinde lenfositlerin çoğunlukta bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonu ve karaciğerde parankim dejenerasyonu II. deneme grubunda I. deneme grubuna göre daha hafif şiddette olduğu dikkati çekti. Sullivan ve ark. (1991) buzağılarda bildirdikleri safra kanal epiteli hiperplazisini, Cooper ve ark. (1996) tavşanda yaptıkları bakır zehirlenmesinde de gözlemlemiştir. Safra kanalı epitelindeki hiperplazi ratta sadece Roy ve ark., (2009) tarafından safra kanalı proliferasyonu olarak bildirilmiş olup, bu durum mevcut çalışmada her iki deneme grubunda da hafif derecede gözlemlendi. I. deneme grubundaki olguların hepatositlerinde gözlenen karyomegali, anizokaryozis ve çekirdekteki vezikül oluşumları II. deneme grubunda daha hafif şiddetteydi, ancak çift çekirdekli hepatositlerin II. deneme grubunda anlamlı derece fazla olduğu görüldü. Çekirdekte gözlenen vezikül yapılarının glikojen birikimi olduğu ifade edilmektedir (Langner ve Denk, 2004). I. deneme grubunda nekrotik hepatositler yanında apoptotik hepatositler ve apoptotik cisimlerin, II. deneme grubunda ise karyolitik çekirdekli fokal hepatosellüler nekroz alanlarının daha fazla olduğu belirlendi. Nitekim karaciğere yapılan TUNEL boyamalarında I. deneme grubunda II. deneme grubuna göre daha fazla sayıda hücrede pozitiflik belirlendi. Hepatositlerde biriken bakır, ROS üretimini artırır (Formigari ve ark., 2007). Üretilen ROS'nin ana hedefinin mitokondri olduğu ve hücrelerin apoptozisine neden olduğu bu çalışmadaki bulgularla uyumluluk göstermektedir (Pourahmad ve ark., 2003; Pulido ve Parrish, 2003; Rana, 2008).

Dördüncü haftadan itibaren hepatositlerde nekrozun daha fazla görülmesi Fuentealba ve Haywood (1988)'un bakır zehirlenmesi oluşturdukları ratlarda yaptıkları ultrastruktural çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bulunmaktadır.

Böbreklere ait histopatolojik bulgular Haywood ve ark. (1985)'nın bulguları ile uyumluydu. I. ve II. deneme grubundaki olgularda genel olarak kortekste konvolut distal tubullerde daha şiddetli, proksimal tubullerde daha hafif şiddette parankim dejenerasyonu, nekroz ve epitellerde deskuamasyon gözlemlendi. Ayrıca kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda şiddetli hidropik dejenerasyon dikkati çekti. I. deneme grubunun tüm olgularında gözlenen özellikle subkapsüler yerleşimli glomeruler atrofi, II. deneme grubunda sadece dört olguda (olgu no: 3,7,8 ve 9) hafif düzeyde görüldü.

Böbrek tubuluslarında gözlenen dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin iskemik ya da toksik nedeni olup olmadığını anlamak için PAS boyası tüm olgulara uygulandı. Boyama sonucunda tubulusların bazal membranlarının sağlam olduğu görüldü. Bu durum böbrek tubuluslarında gözlenen dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin toksik nedeni olabileceğini göstermektedir. Karaciğere yapılan PAS boyama sonucunda Kupffer hücrelerinin sitoplazmasının PAS pozitif boyandığı dikkati çekti. Benzer bulgular koyunda (Bremner, 1998) ve Fischer ratlarında (Aburto ve ark., 2001)'da belirtilmiştir. Bremner (1998) bakır zehirlenmesinde karaciğerde Kupffer hücrelerinin sitoplazmasında rastlanan pembe renkli ve PAS pozitif yapıları Mallory cisimciğine benzetirken, Aburto ve arkadaşları (2001) ise aynı yapıları hyalin kalıntıları olarak tanımlamışlar ve bunların aslında apoptotik cisimler olduğunu bildirmişlerdir. Kupffer hücrelerinde PAS pozitif olan bu yapılara I. deneme grubundaki olgularda rastlanırken, II. deneme grubu ve kontrol grubundaki olgularda rastlanmamıştır. Zaten deneme ve kontrol gruplarının karaciğerlerine yapılan kaspaz-3,-8 ve -9 ile TUNEL boyamalarında I. deneme grubunda II. deneme grubuna göre daha çok sayıda apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Bu bulgular Aburto ve ark. (2001)'nın bulgularını doğrular niteliktedir. II. deneme grubunda apoptozisin I. deneme grubundan daha az olmasının sebebinin ratların bakıra karşı geliştirdikleri toleranstan ya da adaptasyondan kaynaklanabileceği düşünüldü.

Ratta bakır zehirlenmesinin üç fazı olduğu bildirilmiştir. İlk fazda bakır karaciğerde farklı hücresel kompartmanlarda belirgin bir hasar oluşturmaksızın birikmekte, sonraki fazda karaciğerde bakır düzeyi artarken yangı ve nekroz oluşmakta,

son dönemde ise karaciğerde bakır düzeyi düşmeye başlamakta ve parankim dokuda rejenerasyon şekillenmektedir. Bu aşamadan sonra ise ratlarda bakıra karşı tolerans gelişmektedir (Gerberding, 2004). Sunulan çalışmada özellikle 4 hafta bakır uygulanan II. deneme grubundaki ratların karaciğerlerinde rejenerasyonun şekillenmeye başlaması bu hipotezi desteklemektedir.

Yapılan bakır zehirlenmesinde mide ve bağırsaklar, akciğer, kalp, dalak, beyin ve beyincik dokuları histopatolojik olarak incelenmiştir. Amerikan Ulusal Toksikoloji Programında (1990) (Gerberding, 2004) bildirilenlere benzer olarak bakırın, midenin kutan- glandular mukoza geçit bölgesindeki çok katlı yassı epitelde hiperplazi ve hiperkeratozis oluşturduğu gözlemlendi. Ancak hiperplazi ve hiperkeratozisin sadece geçit bölgesinde değil midenin kutan mukozası boyunca biraz daha devam ettiği belirlendi.

Ratta oral yolla oluşan bakır zehirlenmesinin akciğerlerde histopatolojik lezyonlara neden olmadığı bildirilmiştir (Gerberding, 2004). Deneme gruplarına ait akciğerlerde gözlenen, perivasküler ve peribronşioler yoğun lenfosit infiltrasyonu ve peribronşial lenfoid doku hiperplazisi, interalveolar septal dokularda kalınlaşma, amfizem, alveol lümenlerinde lenfosit ve alveolar makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu bulgularının, bakır zehirlenmesi ile ilgili olmayıp mevcut başka bir enfeksiyondan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Amerikan Ulusal Toksikoloji Programında (1993) (Gerberding, 2004) bildirilene benzer olarak bu çalışmadaki bakır zehirlenmesinin de, kalp kasında her hangi bir histopatolojik değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir.

Bakır zehirlenmesinin insan ya da farklı hayvan türlerinde sinir sistemi üzerine etkilerinin fizyopatolojik ve biyokimyasal olarak incelendiği çalışmalara (Strausak ve ark., 2001; Rossi ve ark., 2004; Arciello ve ark., 2005; Niciu ve ark., 2006; Sabolic, 2006) rastlanmasına rağmen, histopatolojik olarak incelendiği çalışmalar oldukça yetersizdir. I. ve II. deneme grubu ratlarında merkezi sinir sisteminin histopatolojik incelemelerinde bakır zehirlenmesi nedeniyle oluştuğu düşünülebilecek herhangi bir lezyona rastlanmamıştır.

Memelilerde bakırı hücre içine alan transmembran proteinleri dokular arasında farklılık göstermesine rağmen, Ctr1'in universal bakır alıcısı olduğu kabul edilmektedir (Samsonov ve ark., 2006). Organizmadaki tüm dokular bakıra ihtiyaç duyar, ancak dokularda Ctr1 ekspresyonu açısından farklılıklar vardır (Holzer ve ark., 2006).

Memelilerde Ctr1 mRNA'sı en yüksek karaciğer, böbrek, testiste daha sonra bağırsaklarda en az beyin, kalp ve kas dokuda eksprese edilmiştir (Zhou ve Gitschier, 1997). Memelilerde bakırın mide ve özellikle duodenumdan emildiği bildirilmektedir (Lutsenko ve ark., 2007). Bakır küpröz forma indirgindikten sonra enterosit membranında bulunan Ctr1 tarafından emilmektedir (Lönnerdal, 2008).

Çalışmada deneme ve kontrol grubu ratlara ait midelerde Ctr1 antikoru ile boyanan hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu açısından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p>0.05$). I. deneme grubunda, midede kutan mukozanın stratum granülozum tabakasındaki hücreler ile glandular mukozanın parietal hücrelerinin sitoplazması homojen, II. deneme grubundaki olguların granüler tabakadaki hücrelerin sitoplazması granüler, parietal hücrelerin ise homojen boyandığı görülmüştür. Kontrol gruplarındaki ratların midelerinde Ctr1 antikoru ile aynı hücrelerde çok daha hafif reaksiyon gözlenmiştir. Holzer ve arkadaşları (2006) normal insan midesinde az sayıda G hücresinin hCtr1 antikoru ile immunoreaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada deneme ve kontrol grupları bağırsaklarında boyanan hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu açısından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p>0.05$). Deneme gruplarında duodenum ve ileum enterosit sitoplazmalarının Ctr1 antikoru ile boyanması, Kuo ve ark. (2006) bulgularıyla, kolon epitelinin boyanması ise Holzer ve ark. (2006) bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca kontrol gruplarının ince bağırsaklarında, Holzer ve ark. (2006)'nın bildirdikleri gibi bir boyanma gözlenmedi. Bauerly ve ark. (2004)'nın Western blot tekniğiyle yaptığı çalışmada diyetteki bakır miktarı arttığında, bağırsaklarda Ctr1 mRNA ve protein düzeylerinin arttığı gözlenmiş, buna bağlı olarak bakır emilimi ve taşınmasının, bakır taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerle düzenlenebileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Elde edilen bulgular bu hipotezi destekler nitelikte bulunmuştur. Ctr1 antikoru ile bakırın asıl emildiği yerler olan mide ve duodenum dışında kolonun da reaksiyon vermiş olması, Ctr1'in farklı dokularda farklı görevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ctr1'in doku spesifik fonksiyonu hala tam olarak bilinmemekle birlikte, son zamanlarda platin içeren antikanser ilaçlarının hücre içine alınmasındaki etkisini araştıran çalışmalar yapılmaktadır. Bu proteinin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasının kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Holzer ve ark., 2006; Samsonov ve ark., 2006).

Memelilerde Ctr1 mRNA'sı en yüksek düzeyde karaciğerde saptanmıştır (Zhou ve Gitschier, 1997). Holzer ve ark. (2006)'da insan karaciğerlerinde hCtr1 mRNA'sını tespit etmelerine rağmen, immunohistokimyasal olarak boyanmadığını bildirmişlerdir. Kuo ve ark. (2006) ise, farelerde Ctr1'in karaciğer safra kanalikülleri boyunca eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Ctr1 antikoru ile yapılan karaciğer boyamasında, I. deneme grubundaki ratların hepatositlerinde özellikle hücre membranı ve membrana komşu sitoplazmada yoğun, II. deneme grubundaki ratlarda ise hepatosit membranlarında hafif düzeyde immunoreaksiyon gözlemlendi. Kontrol grubundaki ratlarda periportal alanlardaki hepatositlerin sitoplazmasında, diğer alanlardaki hepatositlerin ise hücre membranında homojen hafif düzeyde reaksiyon dikkati çekti. Çalışmada karaciğere uygulanan immunoperoksidaz boyamalar sonucunda I. deneme grubu ve kontrol grubu ile II. deneme grubu arasındaki farklılık anlamlı bulundu ($p>0.05$). Buna göre II. deneme grubundaki Ctr1 boyamasının I. deneme grubu ve kontrol grupları ile kıyaslandığında çok daha az olması, Petris, (2004)'in farklı hücre tiplerinde Ctr1 proteininin hücredeki lokalizasyonunun ortamdaki bakır miktarına göre değişiklik gösterebildiği, bunu hücrenin bakır birikimine karşı geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olabileceği sonucunu doğrulamaktadır.

Kuo ve ark. (2006) fare böbreklerinin korteksindeki tubulusların apikal kutuplarında, Holzer ve ark. (2006) ise insan böbreğinde sadece distal tubul epitellerinde Ctr1 antikoru ile boyanma olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada hem proksimal hem de distal tubul epitellerinin sitoplazmalarının bazal kısımlarında, ayrıca Henle kulpu ve pelvis renalisteki epitellerin sitoplazmalarında boyanma saptanmıştır. Kontrol grubu ile II. deneme grubundaki ratların distal tubul epitellerinin Ctr1 antikoru ile benzer reaksiyon gösterdiği, I. deneme grubunun ise II. deneme grubu ile aynı ya da daha hafif boyandığı belirlendi. Deneme ve kontrol grubu böbrekleri arasında boyanan hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu açısından istatistiksel önemlilik gözlenmedi.

Kuo ve ark. (2006)'nın çalışmasına benzer olarak, her iki deneme grubuna ait dalaktaki lenf follikülleri ve periarteriolar lenfoid doku Ctr1 için pozitif. Ancak bu çalışmada ilave olarak kırmızı pulpa alanlarında daha fazla sayıdaki hücrenin sitoplazmasının daha yoğun boyandığı görüldü. Kontrol gruplarında ise deneme grupları ile aynı bölgelerde, ancak çok daha zayıf immunopozitiflik gözlemlendi. Çalışmada deneme

grupları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak da önemlilik gösterirken ($p>0.05$).

Deneme ve kontrol gruplarının kalplerinde bazı kardiyomyositlerin Ctr1 antikoru ile farklı şiddette boyanması, Holzer ve ark. (2006)'nın normal insan kalplerinde belirttikleri boyanma ile benzerlik gösterdi. Bazı araştırmacılar (Kuo ve ark., 2006) fare kalbinde interkalat disklerinin Ctr1 antikoru ile immunoreaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada interkalat disklerinde boyanmaya rastlanmamıştır. I. deneme grubu ile II. deneme grubu ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p>0.05$). Ancak II. deneme grubu ile kontroller arasındaki fark önemsiz bulundu.

Her iki deneme grubunun akciğerlerinde peribronşial lenfoid dokuda bazı mononükleer hücrelerin, interalveolar septal dokuda bazı hücreler ile ayrıca alveolar makrofajların sitoplazmasının şiddetli boyandığı görüldü. Kontrol gruplarında ise peribronşial bölgede tek tük lenfoid hücrelerde boyanmalar göze çarptı. Kuo ve ark., (2006) farelerde yaptıkları çalışmada, akciğer dokusunun Ctr1 antikoru ile pozitif reaksiyon verdiğini bildirmişler, ancak hangi bölge ya da hücrelerde boyanma olduğunu belirtmemişlerdir. Holzer ve ark. (2006) ise normal insan akciğerinde nadiren bronşiyollerin nöroendokrin hücreleri ve alveolar makrofajların Ctr1 ile boyandığını bildirmişlerdir.

Merkezi sinir sisteminde Ctr1 antikoru koroid pleksus (Holzer ve ark., 2006; Kuo ve ark., 2006) ve hipotalamus'ta (Holzer ve ark., 2006) pozitif immunoreaksiyon verdiği belirtilmiştir. Sunulan çalışmada yukarıda belirtilen bulgulara rastlanmamıştır. Beyin ve beyincikte Ctr1 ekspresyonu açısından deneme ve kontrol grupları arasında fark görülmemiştir. Beyinde kornu ammonis bölgesinde hem neuropilde hem de bu bölgedeki bazı nöronların sitoplazmasında, beyincikte ise Purkinje hücreleri ile bazal ganglionlarda bazı nöronların sitoplazmalarında boyanma tespit edildi. Beyin ve beyincikte deneme ve kontrol gruplarına yapılan immunoperoksidaz boyama sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdi.

Petris, (2004)'in belirttiği ve bu çalışmada elde edilen bulgulara göre farklı hücre türlerinde Ctr1 proteininin hücredeki lokalizasyonunun ortamdaki bakır miktarına göre değişiklik gösterebildiği hipotezi karaciğer için geçerli olmakla birlikte, araştırmaya alınan diğer dokular için geçerli olmamıştır. Ctr1 antikoru ile

immunohistokimyasal boyamada, böbrek, dalak, kalp, beyin ve beyincik dokularında kontrol grupları ile deneme grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Elde edilen bulgular Klomp ve ark. (2002)'nin hCtrl'in hücredeki lokalizasyonunun hücre türlerine göre farklılık gösterebildiği, ancak ortamdaki bakır miktarının Ctrl'in lokalizasyonunu etkilemediği sonucunu ve Ctrl'in doku spesifik fonksiyona sahip olabileceği hipotezini (Kuo ve ark., 2006) doğrulamaktadır.

Bakır, organizmadaki tüm hücreler için çok önemli bir element olmasına rağmen fazlalığında toksik etki oluşturması nedeniyle intrasellüler düzeyi sürekli kontrol altında tutulmalıdır (Petrus, 2003). Memelilerde bakır homeostazisinin, bakır metabolizmasında görev alan pek çok protein tarafından kontrol altında tutulduğu bildirilmektedir. Bu amaçla alınan bakır miktarı arttığında bakır metabolizmasında görev alan gen ve proteinlerin miktarlarında ve hücredeki lokalizasyonlarında değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Lönnerdal, 2008). ATP7B bakırın, seruloplazmine bağlanmasını ve fazlalığında safrayla atılmasını sağladığı için bakır homeostazisinde çok önemli bir yere sahiptir (Lutsenko ve ark., 2007; La Fontaine ve ark., 2010). ATP7B genindeki bir bozukluk, insanların Wilson hastalığına benzeyen Toksik Milk Mouse ve Long Evans Cinnamon ratlarının bakır toksikozisine neden olmaktadır (Fuentelba ve Aburto, 2003). Northern blot analizi ile ATP7B'nin karaciğer ve böbrekte yüksek; beyin, plasenta, akciğer ve kalpte daha düşük düzeylerde eksprese edildiği tespit edilmiştir (Bull ve ark., 1993; Muramatsu ve ark., 1998).

ATP7B hepatositlerde bakırın sitoplazmada veziküler kompartmanlarda tutarak seruloplazmin sentezinde kullanmakta, diğer taraftan hepatositlerdeki bakır düzeyi yükseldiğinde veziküler kompartmanlardan perikanaliküler bölgeye taşıyıp safra yoluyla atılmasını sağlamaktadır (Schaefer ve ark. 1999; Cox ve Moore, 2002; Lutsenko ve ark., 2007; La Fontaine ve Mercer, 2007). Schaefer ve ark. (1999) ile Cox ve Moore, (2002) ATP7B'nin, normal şartlarda hepatositlerin sitoplazmasında granüler tarzda, bakır yükseldiğinde ise hepatositlerin perikanaliküler bölgelerinde yine granüler tarzda immunoreaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. ATP7B antikoru ile I. deneme grubundaki çoğu olguda hepatositlerin sitoplazmasında homojen boyanma gözlenirken, sadece bir olguda (olgu no:8) yukarıda adı geçen çalışmalarda belirtildiği gibi hepatositlerin perikanaliküler bölgelerinde granüler tarzda boyandığı görüldü. II. deneme grubu ve kontrol gruplarında ise boyanma I. deneme grubundan farklı olup, sentrilobuler

bölgelerdeki bazı hepatositlerin sitoplazmasının ve çoğunun çekirdeğinin boyandığı gözlemlendi. ATP7B'nin bakır konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içi lokalizasyonunun değiştiğini bildiren çalışmalar (Schaefer ve ark., 1999; Ke ve ark., 2008) vardır. Ancak elde edilen sonuçlar, Moore ve ark. (2002)'nin bildirdiği gibi, ATP7B'nin karaciğerdeki lokalizasyonunun tam olarak belirlenemediği hipotezini doğrulamaktadır. ATP7B ile karaciğer dokularına yapılan immunoperoksidaz boyama sonucunda deneme ve kontrol grupları arasında fark anlamlı bulundu ($p>0.05$). Karaciğerde II. deneme grubunda ATP7B'nin, I. deneme grubundan daha az hücrede boyanması, hepatositlerde biriken bakırın kana verilmeye başlaması ya da safra yoluyla atılmaya başlaması nedeniyle olabileceği düşünüldü.

ATP7B'nin böbrekteki lokalizasyonu farklı kaynaklarda farklı sonuçlarla değerlendirilmiştir. Moore ve Cox, (2002), ATP7B'nin fare böbreğinde renal glomeruluslarda ve medullanın iç ve dış katındaki Henle kulpunda lokalize olduğunu bildirirken, Linz ve ark. (2008) proksimal ve distal tubul epitellerinde eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Deneme ve kontrol gruplarında ATP7B antikoru ile yapılan boyama sonuçları, Linz ve ark. (2008)'nin bulgularıyla kısmen uyumlu olup sadece proksimal tubul epitellerinde boyanma gözlemlendi. Bakır zehirlenmesinde bakırın böbrekte en fazla biriktiği hücreler olan proksimal tubul epitellerinin ATP7B antikoru immunopozitif boyanması, Linz ve ark. (2008)'nin bildirdikleri ATP7B'nin böbrekte bakır homeostazisini sağlamak için ATP7A'ya yardımcı olduğu fikrini doğrulamaktadır. Deneme grupları arasında ATP7B ile boyanan hücre sayısı ve yoğunluğu açısından istatistiksel fark önemsizken, deneme grupları ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulundu ($p>0.05$).

Mide ve bağırsakta ATP7B antikoru ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Weiss ve ark. (2008) ATP7B'yi fare duodenum ve jejunumunda enterositlerin perinükleer ve supranükleer bölgelerinde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, deneme grupları ile kontrol gruplarında midenin parietal hücreleri boyanırken, bağırsaklarda boyanma gözlemlenmedi. Midede ATP7B ile boyanan hücre sayısı ve yoğunluğu I. deneme grubunda II. deneme grubu ve kontrol gruplarına oranla istatistiksel önemlilik gösterdi ($p>0.05$). Karaciğer dışındaki dokularda ATP7B'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, ATP7B'nin fazla bakırın veziküllerde tutulmasını sağlayarak ya da hücrenin apikalinden bakır atılımını sağlayarak bakır homeostazisini sağlayabileceği

düşünülmektedir (Weiss ve ark., 2008; La Fontaine ve ark., 2010).

Rat beyinde ATP7B dağılımını immunohistokimyasal olarak inceleyen Saito ve ark. (1999), hipokampusun CA1 ve CA4 bölgesindeki piramidal nöronlarında, dentate gyrusun granular hücre katında, olfaktorik bölgenin glomerüler hücre katında ayrıca düşük düzeyde serebral korteksin piramidal katındaki nöronlarda ve kaudat putamende, serebellumda ise Purkinje hücrelerinde ATP7B ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ATP7B antikoru ile hem deneme hem de kontrol gruplarına ait beyin ve beyincik dokularında boyama saptandı. Beyinde özellikle talamus bölgesindeki bazı nöronlarda perinükleer olarak orta şiddette ve homojen karakterde gözlenen immunoreaksiyon Saito ve ark. (1999)'nın çalışmasıyla uyumluluk göstermemiştir. Beyincikte ATP7B antikoru ile boyanma, Saito ve ark. (1999) ile Barnes ve ark. (2005) bildirdikleri gibi Purkinje hücrelerinde gözlemlendi, ancak ilave olarak serebellar nükleuslardaki bazı nöronların perinükleer bölgelerinde de görüldü. ATP7B'nin beyin ve beyincikte küproenzimlerin ve seruloplazminin biyosentezini sağladığı düşünülmektedir (Barnes ve ark., 2005).

ATP7B antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalardan elde edilen sonuçlar arasında gözlenen farklılıkları, ATP7B'nin boyanma yoğunluğunun aldehit fiksasyonunun süresiyle ters orantılı olmasına bağlanmaktadır (Linz ve Lutsenko, 2007). Sunulan çalışmada dokular bir gün ön fiksasyon ardından trimlenip bir gün daha fiksasyon yapıldıktan sonra bloklandı. Dolayısıyla dokuların fiksasyon süresi çok uzun tutulmamıştır, ancak elde edilen sonuçlardaki farklılıkların bireysel özelliklerden, uygulanan bakır miktarından ya da zehirlenme süresi ile uygulama yolundaki farklılıktan kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Metallotioneinin memeli dokularındaki ekspresyonu, dokuların gelişim dönemlerine göre değişiklik göstermektedir ve bakırın hücre içi taşınması, hücre içi konsantrasyonunun korunması ve depolanmasında rol oynamaktadır (Nishimura ve ark., 1989; Harris, 2003; Ogra ve ark., 2006). Pek çok ağır metal iyonu (Cu, Zn, Cd, Hg), hormonlar, sitotoksik ve yangısal etkenler, oksidatif ajanlar ve stres durumları karaciğerden MT'in biosentezini tetiklediği bildirilmiştir (Irato ve ark., 2001; Santon ve ark., 2002; West ve ark., 2008). Fuentealba ve ark.(2000) bakır zehirlenmesi yapılan ratlarda MT'in yangısal odakların çevresindeki hepatositlerde çok hafif intrasitoplazmik ve intranükleer boyandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada I. deneme grubundaki

olgularda çoğu hepatositin ve bazı safra kanal epitellerinin hafif düzeyde intrasitoplazmik ve intranükleer, II. deneme grubundaki olgularda ise özellikle sentrilöber bölgelerdeki hepatositlerin aynı karakterde boyandığı tespit edildi. Çalışmada MT antikoru ile pozitif boyanan hepatosit sayısı ile boyanma yoğunluğu açısından deneme grupları ile kontrol grupları arasındaki farklılık istatistiksel önemlilik gösterdi ($p>0.05$).

Karaciğerde MT ekspresyonunu gelişimsel olarak inceleyen Nishimura ve ark. (1989), 60 günlük ratların hepatositlerinin çoğunun sitoplazmik, az olarak nükleer; Fuentealba ve ark. (2000) ise normal karaciğerlerde hepatositlerin çok zayıf intrasitoplazmik ve intranükleer boyandığını bildirmişler, oysa çalışma kapsamındaki kontrol karaciğerlerinin hepatositlerinde boyanma gözlenmemiştir. Bu MT'in gerekli durumlarda karaciğerde biyosentezinin artması nedeniyle deneme gruplarında immunohistokimyasal olarak gösterilebilirken, kontrol karaciğerlerinde MT'i gösterebilecek kadar bu tekniğin hassas olmayabileceğini akla getirmektedir. Hepatosit çekirdeğinin MT antikoru ile pozitif reaksiyon vermesini Nishimura ve ark. (1989) MT'in bu hücrelerden sentezlenmesine bağlarken, Mullins ve Fuentealba, (1998) çekirdekte bakırın MT ile bağlı olarak bulunması şeklinde açıklamıştır. Sunulan çalışmada sadece I. deneme grubu karaciğerlerinde safra kanalı epitellerinin MT antikoru ile boyanması Nishimura ve ark. (1989)'nın, bakır ile bağlı olarak MT'nin safraya salınmasından kaynaklanabileceği hipotezini doğrulamaktadır.

Deneme grupları ile kontrol gruplarına ait böbreklerin MT antikoru ile yapılan boyamalarında elde edilen sonuçlar, Nishimura ve ark. (1989), Schmid ve ark. (1993) ile Mullins ve Fuentealba (1998)'nin ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlarla benzer bulundu. Böbrekteki bakır birikiminin karaciğerde olduğu gibi hem sitoplazmada hem de çekirdekte şekillendiği iyi bilinmektedir. Mullins ve Fuentealba (1998) bakır verilen ratların böbreklerinde MT antikoru ile tubulus epitellerinin sitoplazma ve çekirdeklerinin oluşan MT-Cu kompleksinden dolayı immunorektivite gösterdiğini ve ayrıca böbreklerden MT-Cu kompleksinin idrar yoluyla atılarak bakır homeostazisinin sağlanmasına yardımcı olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada MT antikoru ile böbreklerde pozitif boyanan hücre sayısı ile boyanma yoğunluğu deneme grupları ile kontrol grupları arasındaki farklılık istatistiksel önemlilik göstermiştir ($p>0.05$). Schmid ve ark (1993)'nin MT ekspresyonunun 6. haftada en üst düzeye

ulaştığı yönündeki bulguları, bu çalışmada II. deneme grubunda oluşan boyanmanın I. deneme grubu ve kontrol gruplarına göre daha şiddetli olması sonucu ile desteklenmiştir.

Metallotionein antikoru ile I. deneme grubunda karaciğerde, II. deneme grubunda ise böbrekte daha şiddetli reaksiyon gözlenmesi, subkronik bakır zehirlenmesinde erken dönemde karaciğerde geç dönemde böbrekte MT'in daha fazla eksprese edildiği şeklinde yorumlanabilir. Bu durumu Irato ve ark. (2001) ağır metallere uzun süre maruz kalındığında hepatositlerde oluşan hasar neticesinde bakırın kana verilerek, böbreklerde proksimal tubullerden geri emilmesi ve burada MT'e geçici olarak bağlanması hipotezi ile açıklamışlardır.

Deneme ve kontrol gruplarına ait ince bağırsaklarda literatürle (Bauerly ve ark., 2004; Nishimura ve ark., 1989; Mullins ve Fuentealba, 1998) uyumlu olarak MT antikoru kriptlerin en bazalinde bulunan hücrelerde hem çekirdek hem de sitoplazmada immunopozitif reaksiyon gösterdi. Belirtilen çalışmalarda bu hücrelerin Paneth hücreleri olduğu bildirilmiştir. Paneth hücreleri lizozomlarında bulunan antimikrobiyal madde ile ince bağırsaklarda savunma için özelleşmiş hücreler olmakla birlikte, lizozomlarında bulunan MT ile luminal iyon dengesinin sağlanmasında ve kriptlerin gelişiminde görev yapmaktadırlar (Porter ve ark., 2002). Mullins ve Fuentealba, (1998) hepatosit ve böbrek tubul epitellerinde olduğu gibi Paneth hücrelerinde de lizozomlarda ve çekirdekte Cu-MT kompleksi oluşarak bakır zehirlenmesinin engellendiğini bildirmektedirler. Ancak çalışmadan farklı olarak, villusların kolumnar epitellerinde (Bauerly ve ark., 2004; Nishimura ve ark., 1989) ve Goblet hücrelerinde (Nishimura ve ark., 1989) MT antikoru ile pozitif boyanma bildirilmektedir. Bauerly ve ark. (2004) yemlerine bakır ilave ettikleri farelerde ince bağırsaklarda MT ekspresyonunun arttığını bildirmelerine rağmen, bu çalışmada kontrol grubunda deneme gruplarına göre daha fazla sayıda Paneth hücrelerinin MT antikoru ile immunopozitif boyandığı gözlemlendi. Ancak MT antikoru ile boyana hücre sayısı açısından deneme grupları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel önemlilik göstermedi.

Bakır (Cu^{+2}) glutasyon veya askorbik asit gibi indirgeyici ajanların varlığında Cu^{+} 'e indirgenir. Bakırın indirgenme reaksiyonları olan Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları hidrojen peroksitten süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşmasını katalize eder (Lloyd ve ark., 1997; Bremner, 1998; Valko ve ark., 2005; Roy ve ark.,

2009). Oluşan ROS'nin hücrelerde lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına ve Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasına neden olduğu bildirilmektedir (Britton, 1996; Valko ve ark., 2005). Sonuç olarak serbest bakırın hepatotoksik, neurotoksik ve nefrotoksik etkisi ortaya çıkmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995). Bakırın hücrelerde oluşturduğu oksidatif stres, başta Cu/Zn SOD olmak üzere antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995).

Karaciğer ve böbrekte bakır düzeyi yükseldiğinde Cu/Zn SOD aktivitesinin arttığını bildiren çalışmalar (Irato ve Albergoni, 2005) yanında, karaciğerde bakır düzeyi yükseldiğinde Cu/Zn SOD aktivitesinin azaldığını bildiren çalışmalar da (Roy ve ark., 2009) vardır. Cu/Zn SOD antikoru ile boyanma, karaciğerde I. deneme grubunda orta II. deneme grubunda hafif şiddette, böbrekte ise I. deneme grubunda özellikle kortekste bazı proksimal tubul epitellerinde, II. deneme grubunda korteksten kortikomedullar bölgeye doğru proksimal tubul epitellerinde gözlemlendi. SOD antikoru ile yapılan immunoperoxidaz boyama sonucunda, karaciğer dokusunda I. deneme grubu ile II. deneme grubu ve kontrol grubu arasındaki fark, böbrek dokusunda II. deneme grubu ile I. deneme grubu ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel önemlilik gösterdi ($p>0.05$). Karaciğer ve böbreğe ait kontrol gruplarında boyanma deneme grupları ile aynı olup çok daha hafif şiddetteydi. Cu/Zn SOD antikoru ile immunoreaksiyonun karaciğerde II. deneme grubunda I. deneme grubundan daha zayıf olması, böbreklerde ise II. deneme grubunda I. deneme grubundan daha geniş bir bölgenin boyanması, bakırın karaciğerde oluşturduğu hepatotoksik etkiden sonra kana geçip böbrekler tarafında reabsorbe edilmesi ve bu dönemde karaciğerde rejenerasyonun başlaması ile açıklanabilir. Ratta bakır zehirlenmesine karşı adaptasyonun geliştiği dönem olan 3-5. haftalarda karaciğerde rejenerasyonun oluşmaya başlaması ve böbreklerde bakırın proksimal tubullerde birikmesi Cu/Zn SOD antikoru ile elde edilen boyanma sonuçlarını açıklamaktadır. Irato ve Albergoni, (2005)'nin yaptıkları çalışmada bakır zehirlenmesinde karaciğerde Cu/Zn SOD aktivitesinin arttığı yönündeki bulgularının, sunulan çalışmanın sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görüldü.

Saito ve ark. (1999) SOD'un beyin ve beyincikte ATP7B'nin eksprese olduğu bölgeler olan hipokampusun kornu ammonis ve dentate gyrusunda, olfaktorik bölgede, serebral kortekste, kaudat putamende ve Purkinje hücrelerinde eksprese olduğunu

belirlemişlerdir. Böylece MSS’de nöronlarda ATP7B’nin SOD gibi küproenzimlerin biyosentezini sağladığını, üretilen SOD’un süperoksit radikallerini tutarak nöronal hasarı engellediğini ileri sürmüşlerdir. Bakır zehirlenmesinde nöronlarda oluşan oksidatif stres mitokondrial hasara, sonuç olarak nöron dejenerasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Arciello ve ark., 2005). Ancak Cu/Zn SOD antikoru ile deneme grupları ile kontrol gruplarına ait beyin ve beyincikte boyanma sağlanamadı.

Bakır organizmada pek çok protein ve enzimin yapısına girdiğinden dolayı önemli bir element olması yanında intrasellüler birikimi toksik etkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Tüm toksik metallerde olduğu gibi bakır, intrasellüler antioksidanların azalması, ROS’nin detoksifikasyonunu sağlayan bazı antioksidan enzimlerin inhibisyonu ve ROS üretiminin artması ile karakterize oksidatif strese neden olmaktadır (Formigari ve ark., 2007). Oksidatif stres arttığında hücrelerin nekroz ya da apoptozis ile ölüme gittiği bildirilmektedir (Kannan ve Jain, 2000; Roy ve ark., 2009). Hücrede normal şartlarda mitokondride hücresel solunum sırasında az miktarda ROS üretilirken, lizozomlarda bakır biriktiğinde bu organel tarafından ROS’nin üretiminin arttığı ve üretilen ROS’nin ana hedefinin mitokondri olduğu ileri sürülmüştür (Pourahmad ve ark., 2003; Pulido ve Parrish, 2003; Rana, 2008). ROS, mitokondri permeabilitesini ya da transmembran potansiyelini bozarak veya matriksten Ca^{+2} ’un sitosole salınmasına neden olarak etkilerini gösterdikleri ifade edilmektedir (Kannan ve Jain, 2000; Krumschnabel ve ark., 2005; Sabolic, 2006; Roy ve ark., 2009). Sinerjistik etkiye sahip olan ROS ve Ca^{+2} , mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına, organelin su alıp şişmesine ve sitokrom c’nin sitosole salınmasına neden olarak apoptozisin intrinsik yolu olan kaspaz-9’u ve devamında kaspaz-3’ü aktive ettiği ileri sürülmüştür (Kannan ve Jain, 2000, Sabolic, 2006). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada, hepatositlerde bakır zehirlenmesi nedeniyle oluşan ROS’nin asit sfingomiyelinazı aktive edip, seramidin üretilmesine neden olarak hücreyi apoptozisin intrinsik yoluyla ölüme götürdüğü ileri sürülmüştür (Brewer, 2007). Diğer taraftan Nawaz ve ark. (2006) alabalıklarda oluşturdukları bakır zehirlenmesinde hepatositlerde oluşan ROS’nin intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu artırarak ERK (ekstracellüler signal-regulated kinase)’in aktivasyonuna, böylece doğrudan hücrenin çekirdeğine etki ederek apoptozisine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Toksik metaller nedeniyle fazla üretilen

ROS'nin TNFR ve Fas reseptörleri aracılığıyla kaspaz-8'i aktive ettiği de ileri sürülmektedir (Strand ve ark., 1998; Pulido ve Parrish, 2003).

Mufti ve ark. (2006) insanlarda ATP7B genindeki bozukluğa bağlı olarak gelişen Wilson hastalığı ve diğer bakır zehirlenmelerinde, hücrede bakır düzeyi yükseldiğinde anti-apoptotik bir protein olarak bilinen X-bağılı apoptozis inhibitörü (XIAP; X- linked inhibitor of apoptosis)'nın düzeyinin şiddetle düştüğünü, sonuçta kaspaz-3'ün aktive olduğunu bildirirlerken, Strand ve ark. (1998) ise Wilson hastalarında hepatositlerde CD95 ve CD95L (Fas-FasL) mRNA ekspresyonunun arttığı ve buna bağlı olarak kaspaz-8'in aktive olarak apoptozisin geliştiğini ileri sürmüşlerdir.

Bakır zehirlenmesi ile ilgili yapılan pek çok çalışmada çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sunulan çalışmada karaciğere uygulanan immunoperoksidaz testte kaspaz-9,-8 ve -3 antikorları ile I. deneme grubunda pozitif boyanan hücre sayısı II. deneme grubu ve kontrol grubuna göre istatistiksel önem göstermiştir ($p>0.05$). Karaciğerde I. deneme grubunda kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz-3 immunopozitifken, II. deneme grubunda sadece birkaç hepatosit kaspaz-3 ile pozitif reaksiyon vermiştir. Karaciğere yapılan TUNEL boyamalarında ise, I. deneme grubundaki ratlarda II. deneme grubuna göre daha fazla sayıda hücrede pozitiflik belirlenirken, pozitif boyanan hücre sayısına göre I. deneme grubu ile II. deneme grubu ve kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p>0.05$). Ayrıca I. deneme grubunda duktus biliferi epitellerinde de TUNEL pozitif reaksiyonlara rastlandı. Elde edilen sonuçlara göre bakır zehirlenmesinin akut döneminde hepatositlerin nekroz yanında apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yollarının her ikisini de kullanabildikleri görüldü. Subkronik dönemde hepatositlerde nekrozun daha fazla görülmesi Haywood ve ark. (1985)'nin ifadeleriyle uyumlu bulunmaktadır.

Toksik metaller böbreklerde reabsorbe edildikleri yer olan proksimal konvolut tubul epitellerinde fonksiyon bozukluğuna ve glomeruluslarda hasara neden olduğu bilinmektedir (Sabolic, 2006). Böbrekte I. deneme grubunda kaspaz-9 ile, kaspaz-8 ve kaspaz-3'e göre daha fazla sayıda tubulus epitelinin immunoreaksiyon verdiği, II. deneme grubunda ise kaspaz-9 ve kaspaz-3 ile çok az sayıda hücrenin reaksiyon verip kaspaz-8'in hiç reaksiyon vermediği görüldü. TUNEL boyamalarında ise I. deneme grubunda II. deneme grubuna göre daha fazla sayıda hücrenin çekirdeğinde pozitiflik tespit edildi. Çalışmada kaspaz-9 pozitif hücre sayısına göre I. deneme grubu ile II.

deneme grubu ve kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli iken ($p>0.05$), kaspaz-3 pozitif hücre sayısı açısından I. deneme grubu ile II. deneme grubu arasındaki farklılık önemsiz, ancak deneme grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p>0.05$). TUNEL metodunda pozitif hücre sayısı ise deneme grupları arasında istatistiksel önemsiz ancak deneme grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel önem gösterdi ($p>0.05$). Böbrekte bakır zehirlenmesinin akut döneminde apoptozisle ölen tubulus epitellerinde kaspaz-9'un pozitif olması, literatürde (Sabolic, 2006) belirtildiği gibi ROS'nin çeşitli yollarla apoptozisin intrinsik yolunu uyarmasıyla açıklanabilir.

Bakırın neden olduğu neuronal apoptozisin mekanizmaları çeşitli şekillerde açıklanmaktadır. Bakır zehirlenmesinin incelendiği bir çalışmada neuronal apoptozisin, p53 proteinine bağımlı ya da p53 proteininden bağımsız oluşabileceği bildirilmiştir (Rana, 2008). Rossi ve ark., (2004) ve Sheline ve Choi (2004) neuronlarda oksidatif stres sonucu meydana gelen mitokondrial hasara bağlı olduğunu, Tassabehji ve ark. (2005) p53 proteininin transkripsiyonel aktivitesinin bakır tarafından değiştirilmesinin bir sonucu olduğunu, Vanlandingham ve ark. (2005) ise p53 proteininin nükleer translokasyon ve indüksiyonuna bağlı olarak apoptozisin geliştiğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada deneme ve kontrol gruplarına ait beyin ve beyincik dokularının kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 antikoru ile yapılan immunoperoksidaz boyamalarda, beyincikte Purkinje hücrelerinin ve serebellar nükleuslarda bazı neuronların sadece kaspaz-9 antikoru ile pozitif reaksiyon vermesi, bakırın p53 proteinine bağımlı ya da bağımsız olarak neuronal apoptozise neden olabileceği hipotezini destekler nitelikte bulunmuştur.

Metallerin toksik etkilerini azaltmak için öncelikle böbreklerde tubulus epitellerinde normalde bulunan Zn-MT'den Zn'nun ayrılıp MT'in bu metallerle bağlanması sağlanır. Bu savunma yeterli olmadığında daha sonraki aşamada MT ve SOD üretiminin arttığı ileri sürülmüştür (Sabolic, 2006). Sabolic, (2006)'ın çalışması ile uyumlu olarak, antioksidan etkiye sahip metallotioneinin her iki deneme grubunda yüksek olması ve Cu/Zn SOD ise II. deneme grubunda, I. deneme grubu ve kontrol gruplarına göre daha şiddetli reaksiyon vermesi subkronik bakır zehirlenmesinde oluşan ROS'nin detoksifikasyonu için antioksidan aktivitenin arttığını göstermektedir. Ancak mevcut antioksidan mekanizma ROS'nin oluşturduğu hücresel hasarı engelleyemediğinde hücrelerde nekroz ya da apoptozis şekillenir. Sabolic, (2006) hasara

uğrayan hücrede mitokondri ATP üretebiliyorsa apoptotik yol ile, ATP sentezleyemiyorsa nekroz yoluyla öldüğünü, bu nedenle bazı metallerle oluşan zehirlenmesinde hem nekroz hem de apoptozisin birlikte görüldüğünü ileri sürmüştür. Ancak bakır zehirlenmesi nedeniyle oluşan ROS lizozom membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak lizozomal enzimlerin salınmasına ve sitototoksik etkinin ortaya çıkmasına neden olduğu da unutulmamalıdır (Pourahmad ve ark., 2001). Ayrıca bakır zehirlenmesinde hepatosit ve böbrek tubulus epitellerinin çekirdeklerinde biriken bakırın, çekirdeği hasara uğratarak renal ve/veya hepatik nekroza neden olduğunu ileri süren bir çalışma da bulunmaktadır (Haywood ve ark., 1985).

5. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre bakır zehirlenmesinin süreye bağlı olarak farklı organ ve dokularda farklı etkiler gösterirken, bireysel farklılıkların karaciğerde bakır birikimini etkileyebildiği, belirtilen sürelerde ve miktarda bakırın akut dönemde karaciğeri, subkronik dönemde böbreği daha fazla etkilediği, akciğer, kalp, dalak, beyin ve beyincik dokularını ise etkilemediği, subkronik- kronik dönemde ratların karaciğerinde bakıra adaptasyonun geliştiği sonucuna varılmıştır.

Ctr1 ile ATP7B'nin zehirlenmenin subkronik dönemde karaciğer, dalak ve kalp dokularında azaldığı görülmüştür. Böbrek, mide, beyin ve beyincik dokularında ise Ctr1 ekspresyonu artarken, ATP7B'nin aynı dokularda sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, Ctr1 proteininin hücredeki lokalizasyonunun ortamdaki bakır miktarına göre değişiklik gösterebildiği ancak bu durumun tüm dokular için geçerli olmadığı ayrıca, Ctr1'in doku spesifik fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmüştür. ATP7B'nin ise farklı dokularda ortamdaki bakır miktarına göre ekspresyonu ve hücredeki lokalizasyonunun değişebileceği sonucuna varılmıştır.

Metallotionein ve Cu/Zn SOD'ın bakır zehirlenmesinin akut döneminde karaciğerde, subkronik döneminde böbrekte, hem akut hem de subkronik dönemde bağırsak ve kalp dokusunda immunopozitif olduğu belirlenmiştir. İncelenen dokularda bakır zehirlenmesine karşı korumada MT ve Cu/Zn SOD'ın etkin bir göreve sahip oldukları anlaşılmıştır. Kalp kasında Cu/Zn SOD'ın yüksek düzeyde ekspresyonu, bakır zehirlenmesinde kalbin daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Memelilerde bakır metabolizmasında görev alan proteinler, bakır homeostazisini kontrol altında tutmaktadır. Alınan bakır miktarı arttığında bakır metabolizmasında görev alan gen ve proteinlerin miktarlarında ve hücredeki lokalizasyonlarında değişiklikler olduğu ve bunun da hücrenin bakır birikimine karşı geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bakır zehirlenmesinin akut döneminde karaciğer hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla apoptozise uğrarken, böbrek ve beyin dokularında intrinsik yolu kullandığı, kalpte ise hem akut hem de kronik dönemde her iki yolu da kullandığı görülmüştür. Bu bulgular göre akut bakır zehirlenmesinde dokulardaki apoptozisin farklı yollarla başlatılabileceği anlaşılmıştır. Bakır zehirlenmesinde dokularda gözlenen apoptozisin

intrinsik ve ekstrinsik yollarını tetikleyen protein ve reseptörlerin daha ayrıntılı ve farklı metotlarla çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Aburto, E.M., Cribb, A.E., Fuentealba, I.C., Ikede, B.O., Kibenge, F.S.B., Markham, F. (2001). Morphological and biochemical assessment of the liver response to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, **65**, 97-103.
- Anderson, K.M., Seed, T., Ou, D., Haris, J.E. (1999). Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death. *Medical Hypotheses*, **52**, 451-463.
- Anonim 1970, FAO Nutrition Meeting Report Series No. 48A WHO/FOOD ADD/70.39,
Eriřim: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48aje06.htm>
Eriřim tarihi: 01.02.2008
- Anonim 2009, Rhodanine staining protocol,
Eriřim: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/rhodanine_ellis.htm.
Eriřim tarihi: 15.07.2009
- Arciello, M., Rotilio, G., Rossi L. (2005) Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochemical and biophysical research communications*, **327**, 454–459.
- Arredondo, M., Nunez, M.T. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 313-327.
- Aston, N.S., Morris, P.A., Tanner, M.S., Variend, S. (1998). An animal model for copper-associated cirrhosis in infancy. *Journal of Pathology*, **186**, 215-221.
- Aydın, Y. (2008). Veteriner Temel Patoloji. Ayban Matbaacılık. Ankara.
- Barnes, N., Tsivkovskii, R., Tsivkovskaia, N., Lutsenko, S. (2005). The copper-transporting ATPases, Menkes and Wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum. *The Journal Of Biological Chemistry*, **280**, 9640–9645.
- Bauerly, K.A., Kelleher, S.L., Lönnerdal, B. (2004). Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 155-162
- Bauerly, K.A., Kelleher, S.L., Lönnerdal, B. (2005). Effects of copper supplementation on copper absorption, tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, **288**, 1007-1014.
- Bremner, I. (1998). Manifestation of copper excess. *American Society for Clinical Nutrition*. **67**, 1069-1073.

- Bissig, K.B., Honer, M., Zimmermann, K., Summer, K.H., Solioz, M. (2005). Whole animal copper flux assessed by positron emission tomography in the Long–Evans cinnamon rat a feasibility study. *Biometals*, **18**, 83–88.
- Brewer, B.J. (2007). A brand new mechanism for copper toxicity. *Journal of hepatology*, **47**, 621-622.
- Brewer, G.J. (2010). Copper toxicity in the general population. *Clinical Neurophysiology*, **211**, 459-460.
- Britton, R.S. (1996). Metal-induced hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease*, **16**, 3-12.
- Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., Cox, D.W. (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P–type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics* , **5**, 327-337. “Alınmıştır” Cox, D.W., Moore, S.D.P. (2002). Copper transporting P-type ATPases and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **34**, 333-338.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. **3th ed.** W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Camakaris, J., Voskoboinik, I., Mercer, J.F. (1999). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **261**, 225-232.
- Chipuk, J.E., Green D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*, **18**, 157-164.
- Cohen. G.M. (1997). Caspase: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, **326**, 1- 16.
- Cooper, G.L., Bickford, A.A., Charlton, B.R., Galey, F.D., Willoughby, D.H., Grobner, M.A. (1996). Copper poisoning in rabbits associated with acute intravascular hemolysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 394-396.
- Cox, D.W., Moore, S.D.P. (2002). Copper transporting P-type ATPases and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **34**, 333-338.
- Dameron, C.T., Harrison, M.D. (1998). Mechanisms for protection against copper toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 1091-1098.
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell*, **44**, 817-829.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **35**, 495–516.

- Erer,H., Kiran, M.M., Çiftçi, M.K. (2000). Veteriner Genel Patoloji, **1. baskı.** Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş. Konya.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, **148**, 2207-2216.
- Fong, R.N., Gonzalez, B.P.E., Fuentealba, I.C., Cherian, M.G. (2004). Role of tumor necrosis factor- α in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **200**, 121–130.
- Forman, O.P., Boursnell, M.E.G., Dunmore, B.J., Stendall, N., Sluis, B., Fretwell, N., Jones, C., Wijmenga, C., Rothuizen, J., Oost, B.A., Holmes, N.G., Binns, M.M. (2005). Characterization of the COMMD1 (MURR1) mutation causing copper toxicosis in Bedlington terriers. *Animal Genetics*, **36**, 497-501.
- Formigari, A., Irato, P., Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative biochemistry and physiology*, **146**, 443–459.
- Fuentealba, I.C., Haywood, S., Trafford, J. (1987). Evaluation of histochemical methods for the detection of copper overload in rat liver. *Liver*, **7**, 277-282.
- Fuentealba, I.C., Haywood, S. (1988). Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. I. Ultrastructural changes in the liver. *Liver*, **8**, 372-380.
- Fuentealba, I., Haywood, S., Foser, J. (1989). Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper copper- loaded rat. II. Pathogenesis of copper toxicity in the liver. *Experimental and Molecular Pathology*, **50**, 26-37.
- Fuentealba, I.C., Davis, R.W., Elmes, M.E., Jasani, B., Haywood, S. (1993). Mechanisms of tolerance in the copper- loaded rat liver. *Experimental and Molecular Pathology*, **59**, 71-84.
- Fuentealba, I.C., Mullins, J.E., Aburto, E.M., Lau, J.C., Cherian, G.M. (2000). Effect of age and sex on liver damage due to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *Clinical Toxicology*, **38**, 709-717.
- Fuentealba, I.C., Aburto, E.M. (2003). Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology*, **2**, 1-12.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stres, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**, 147- 163.
- Geberding, J.L. (2004). Toxicological profile for copper. U.S. Department of Health and Human Service. Atlanta, Georgia.

- Gooneratne, S.R., Howell, J.M., Cook R.D. (1980). An ultrastructural and morphometric study of the liver of normal and copper poisoned sheep. *The American Journal of Pathology*, **99**, 429–449.
- Groenendyk, J., Michalak, M. (2005). Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, **52**, 381–395.
- Harada, M., Sakisaka, S., Yoshitake, M., Shakadoh, S., Gondoh, K., Sata, M., Tanikawa, K. (1993). Biliary copper excretion in acutely and chronically copper-loaded rats. *Hepatology*, **17**, 111–117.
- Harris, E. (2003). Basic and clinical aspects of copper. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **40**, 547–586.
- Haywood, S., Loughran, M., Batt, R.M. (1985). Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. intracellular localization of copper in the liver and kidney. *Experimental and Molecular Pathology*, **43**, 209–219.
- Haziroğlu, R., Milli, Ü. (2000). Veteriner Patoloji. Ankara, **2.Baskı**, Medipres, Ankara.
- Hellman, N.E., Gitlin, J.D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Reviews of Nutrition*, **22**, 439–453.
- Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P., Vasak, M. (2001). Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, **55**, 133–145.
- Holzer, A.K., Varki, N.M., Le, Q.T., Gibson Peter Naredi, M.A., Howell, S.B. (2006). Expression of the human copper influx transporter 1 in normal and malignant human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **54**, 1041–1049.
- Irato, P., Santon, A., Ossi, E., Albergoni, V. (2001). Interactions between metals in rat liver and kidney: Localization of metallothionein. *The Histochemical Journal*, **33**, 79–86.
- Irato, P., Albergoni, V. (2005). Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rat with particular reference to the synthesis of induced-metalllothionein. *Chemico-Biological Interactions*, **155**, 155–164.
- Johnson, F., Giulivi, C. (2005). Superokside dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 340–352.
- Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. (1997). Veterinary Pathology, **Sixth Edition**, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (2007). Pathology of Domestic Animals. Edited by M.G. Maxie. **Fifth edition**, Saunders Elsevier, London.

- Kannan, K., Jain, S. (2000). Oxidative stres and apoptosis. *Pathophysiology*, 7, 153-163.
- Karabulut, A., Canbolat, Ö. (2005). Yem değerlendirme ve analiz yöntemleri, Yemlerin incelenmesi, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa.
- Karademir, B. (2007). Atomik absorbsiyon spektrofotometrede kan-serumu bakır ve çinko analizleri için bazı numune hazırlama yöntemlerinin karşılaştırılmaları. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13, 61-66.
- Karagül, H., Altıntaş, A., Fidancı, U.R., Sel, T. (2000). Klinik Biyokimya, 1. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Kawai, K., Liu, S., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Borisenko, G.G., Jiang, J.F., Croix, C.M., Fabisiak, J.P., Pitt, B.R., Kagan, V.E. (2000). Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate. *Chemistry Research Toxicology*, 13, 1275-1286.
- Kaya, S., Pirinçci, İ., Bilgili, A. (2002). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Ke, B., Llanos, R.M.L., Mercer, J.F.B. (2008). ATP7A transgenic and nontransgenic mice are resistant to high copper exposure. *The Journal of Nutrition*, 138, 693–697.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Supratim Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 267–294.
- Klomp, A.E.M., Tops, B.B.J., Van Den Berg, I.E.T., Berger, R., Klomp, L.W.J. (2002). Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCtr1). *Biochemical Journal*, 364, 497-505.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Berger, C., Hofer, B. (2005). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209, 62-73.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins. S.L. (1995). Basic Pathology. Nobel Tıp Kitapevi. Editör.Uğur Çevikbaş.
- Kuo, Y.M., Gybina, A.A., Pyatskowit, J.W., Gitschier, J., Prohaskay, J.R. (2006). Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *The Journal of Nutrition*, 136, 21–26.

- La Fontaine, S., Mercer, J.F.B. (2007). Trafficking of the copper- ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **463**, 149-167.
- La Fontaine, S., Ackland, M.L., Mercer, J.F.B. (2010). Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**, 206-209.
- Langner, C., Denk, H. (2004). Wilson Disease. *Virchows Archiv*, **445**, 111-118.
- Lee, J., Prohaska, J.R., Thiele, D.J. (2001). Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **98**, 6842-6847.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 797-811.
- Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N. (1998). Copper transport. *American Society for Clinical Nutrition*, **67**, 965-971.
- Lindquist R.R. (1968). Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. 3. The effect of copper on rat liver lysosomes. *The American Journal of Pathology*, **53**, 903- 927.
- Linz, R., Lutsenko, S. (2007). Copper-tanspoting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **39**, 403-407.
- Linz, R., Barnes, N.L., Zimnicka, A.M., Kaplan, J.H., Eipper, B., Lutsenko, S. (2008). Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and *Atp7b*^{-/-} kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **294**, 53-61.
- Lloyd, R.V. Hana, P.M. Mason, R.P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, 885-888.
- Lönnerdal, B. (2008). Intestinal regulation of copper homeostasis: A developmental perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, **88**, 846-850.
- Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. **Third edition**, McGraw-Hill, NewYork.
- Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, O.Y. (2007). Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiological Reviews*, **87**, 1011-1046.

- Mehta, R., Templeton, D.M., O'Brien, P.J. (2006). Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity II. Copper toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, **163**, 77-85.
- Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends in Genetics*, **14**, 410-416.
- Mirkes, P.E. (2002). 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology*, **65**, 228-239.
- Moore, S.D.P., Cox, D.W. (2002). Expression in mouse kidney of membrane copper transporters Atp7a and Atp7b, *Nephron*, **92**, 629-634.
- Moore, S.D.P., Helmle, K.E., Prat, H.L., Cox, D.W. (2002). Tissue localization of the copper chaperone ATOX1 and its potential in disease. *Mammalian Genome*, **13**, 563-568.
- Mullins, J.E., Fuentealba, I.C. (1998). Immunohistochemical detection of metallothionein in liver, duodenum and kidney after dietary copper overload in rats. *Histology and Histopathology*, **13**, 627-633.
- Muramatsu, Y., Yamada, T., Moralejo, D.H., Suzuki, Y., Matsumoto, K. (1998). Fetal copper uptake and a homolog (Atp7b) of the Wilson's disease gene in rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, **101**, 225-31. "Alınmıştır" Cox, D.W., Moore, S.D.P. (2002). Copper transporting P-type ATPases and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **34**, 333-338.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, **403**, 98-103.
- Nawaz, M., Manzl, C., Lacher, V., Krumschnabel, G. (2006). Copper-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinase in trout hepatocytes: the role of reactive oxygen species, Ca^{+2} , and cell energetics and the impact of extracellular signal-regulated kinase signaling on apoptosis and necrosis. *Toxicological Sciences*, **92**, 464-475.
- Niciu, M.J., Ma, X.-M., El Meskini, R., Ronnett, G.V., Mains, R.E., Eipper, B. A. (2006). Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience*, **139**, 947-964.
- Nishimura, H., Nishimura, N., Tohyama, C. (1989). Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **37**, 715- 722.

- Nyasae, L., Bustos, R., Braiterman, L., Eipper, B., Hubbard, A. (2007). Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: Copper-dependent redistribution between two intracellular sites. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **292**, 1181–1194.
- Ogra, Y., Aoyama, M., Suzuki, K.T. (2006). Protective role of metallothionein against copper depletion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **451**, 112–118.
- Pena, M.M.O., Lee, J., Thiele, D.J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of Nutrition*, **129**, 1251–1260.
- Petris, M.J. (2004). The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch- European Journal Physiology*, **447**, 752–755.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., Ganz, T. (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 156–170.
- Pourahmad, J., Ross, S., J. O'Brien, P. (2001). Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu but not Cd. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**, 89–97.
- Pourahmad, J., O'Brien, P., Jokar, F., Daraei, B. (2003). Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, **17**, 803–810.
- Prohaska, J.R., Gybina, A.A. (2004). Intracellular copper transport in mammals. *The Journal of Nutrition*, **134**, 1003–1006.
- Pulido, M.D., Parrish, A.R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research*, **533**, 227–241.
- Rana, S.V.S. (2008). Metals and apoptosis: recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22**, 262–284.
- Ravia, J.J., Stephen, R.M., Ghishan, F.K., Collins, J.F. (2005). Menkes copper ATPase (ATP7A) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on brush-border and basolateral membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 36221–36227.
- Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., Walter, P., Yaffee, M. (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1271**, 67–74.
- Rossi, L., Lombardo, M.F., Ciriolo, M.R, Rotilio, G. (2004). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochemical Research*, **29**, 493–504.

- Roy, D.N., Mandal, S., Sen, G., Biswas, T. (2009). Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*, **182**, 136–147.
- Sabolic, I. (2006). Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. *Nephron Physiology*, **104**, 107-114.
- Saito, T., Okabe, M., Hosokawa, T., Kurasaki, M., Hata, A., Endo, F., Nagano, K., Matsuda, I., Urakami, K., Saito, K. (1999). Immunohistochemical determination of the Wilson copper transporting P-type ATPase in the brain tissues of the rat. *Neuroscience Letters*, **266**, 13-16
- Samsonov, S.A., Platonova, N.A., Skvortsov, A.N., Tsymbalenko, N.V., Vasin, A.V., Puchkova, L.V. (2006). Relationships between CTR1 activity and copper status in different rat organs. *Molecular Biology*, **40**, 207-217.
- Santon, A., Giannetto, S., Sturniolo, G.C., Medici, V., D'Incà, R., Irato, P., Albergoni, V. (2002). Interactions between Zn and Cu in LEC rats, an animal model of Wilson's disease. *Histochemical Cell Biology*, **117**, 275–281.
- Saris, N.E., Skulski, I.A. (1991). Interaction of Cu^+ with mitochondria. *Acta Chemica Scandinavica*, **45**, 1042-1046.
- Schaefer, M., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Gitlin, J.D. (1999). Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *American Journal of Physiology Gastrointest Liver Physiology*, **276**, 639-646.
- Schmid, K.W., Morgan, J.M., Ofjyer, D., Hittmair, A., Haywood, S., Jasani, B. (1993). Quantitative immunohistochemical evaluation by image analysis of metallothionein in copper-loaded rat kidney. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **41**, 727-731.
- Sharp, P.A. (2003). Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **35**, 288-291.
- Sheline C.T., Choi D.W. (2004). Cu^{+2} toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Annals of Neurology*, **55**, 645–653.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, **5**, 415–418.
- Simpson, D.M., Mobasher, A., Haywood, S., Beynon, R.J. (2006). A proteomics study of the response of North Ronaldsay sheep to copper challenge. *BMC Veterinary Research*, **2**, 1-14.

- Siraki, A.G., Pourahmad, J., Chan, T.S., Khan, S., O'Brien, P.J. (2002). Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 2–10.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Mierau, G.W., Hambidge, K.M., Shikes, R.H. (1990). Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology*, **99**, 1061–1071.
- Solary, E., Dubrez, L., Eymin, B. (1996). The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *European Respiratory Journal*, **9**, 1293–1305.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**, 321–336.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Grambihler, A., Hug, H., Volkmann, M., Otto, G., Wesch, H., Mariani, S.M., Hack, V., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R. (1998). Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1 /Fas) mediated apoptosis, *Nature Medicine*, **4**, 588–593.
- Strausak, D., Mercer, J.F.B., Dieter, H.H., Stremmel, W., Multhaup, G. (2001). Copper in disorder with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin*, **55**, 175–185.
- Sullivan J.M., Janovitz, E.B., Robinson, F.R. (1991). Copper toxicosis in veal calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **3**, 161–164.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **57**, 386–398.
- Tassabehji, N.M., VanLandingham, J.W., Levenson, C.W. (2005). Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells. *Experimental Biology and Medicine*, **230**, 699–708.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 1161–1208.
- Vanlandingham, J.W., Tassabehji, N.M., Somers, R.C., Levenson, C.W. (2005). Expression profiling of p53-target genes in copper-mediated neuronal apoptosis. *Neuromolecular Medicine*, **7**, 311–324.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele D.R., Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*, **84**, 627–639.
- Voskoboinik, I., Greenough, M., La Fontaine, S., Mercer, J. F. B., Camakaris, J. (2001). Functional studies on the wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **281**, 966–970.

- Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B., Gitlin, J.D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease*, **6**, 221-230.
- Weiss, K.H., Wurz, J., Gotthardt, D., Merle, U., Stremmel, W., Füllekrug, J. (2008). Localization of the Wilson disease protein in murine intestine. *Journal of Anatomy*, **213**, 232–240.
- West, A.K., Hidalgo J., Eddins D., Levin, E.D., Aschner M. (2008). Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *NeuroToxicology*, **29**, 489–503.
- Wijmenga, C., Klomp, L.W.J. (2004). Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proceedings of the Nutrition Society*, **63**, 31-39.
- Zhou, B., Gitschier, J. (1997). hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of The. National Academy of Sciences*, **94**, 7481–7486.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Yonca Betil
 Soyadı : KABAK
 Doğum yeri ve tarihi : Kayseri/ Bünyan, 28/12/1973
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 Adres : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Patoloji Anabilim Dalı, 55139, Kurupelit/SAMSUN
 Telefon : 0362 312 19 19/ 3914
 E- posta : ybkabak@omu.edu.tr

II. Eğitim

1990-1995: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi ANKARA
 1984-1990: Kayseri Lisesi KAYSERİ
 1979-1984: Atatürk İlkokulu Bünyan/ KAYSERİ
 Yabancı dili: İngilizce

III. Mesleki Deneyim

2004- Araştırma Görevlisi

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Patoloji Derneği

V. Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Gulbahar MY, Davis WC, Guvenc T, Yarim M, Parlak U, **Kabak YB**. 2007. Myocarditis associated with foot and mouth disease virus Type O in a lambs. Veterinary Pathology, 44: 589-599.
2. Gulbahar MY, Guvenc T, Yarim M, **Kabak YB**, Sozgen Y. 2007. Mammary fibroadenoma in a lamb. Journal of Veterinary Science, 8:423-425.

3. Piskin A, Gulbahar MY, Tomak Y, Gulman B, Hokelek M, Kerioglu S, Koksall B, Alic T, **Kabak YB**. 2007. Osteoarthritis models after anterior cruciate ligament resection and medial meniscectomy in rats. A histological and immunohistochemical study. Saudi Medical Journal, 28: 1796-1802.
4. Guvenc T, Yarim M, Gulbahar MY, **Kabak YB**. 2008. Immunohistochemical distribution of alpha B-crystallin in cerebellum of dogs infected with canine distemper virus. Acta Veterinaria Hungarica, 56: 117-123.
5. Gulbahar MY, Kabak M, Yarim M, Guvenc T, **Kabak YB**. 2009. Persistent cloaca, fused kidneys, female pseudohermaphroditism and skeletal anomalies in a Simmental calf. Anatomia Histologia Embryologia, 38: 229-232.
6. Gulbahar MY, Davis WC, Yarim Y, Guvenc T, Umur Ş, **Kabak YB**, Karayigit MO, Beyhan YE. 2009. Characterization of local immune response against lungworms in naturally infected sheep. Veterinary Parasitology, 160: 272-278.
7. Yarim M, Gulbahar MY, Guvenc T, Karahan S, Harada N, **Kabak YB**, Karayigit MO. 2010. Aromatase expression in the cerebellum of the dog infected with canine distemper virus. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 123: 301-306.
8. Cakiroglu D, Meral Y, Pekmezci D, Onuk EE, **Kabak YB**. 2010. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on humoral and cellular immunity of Jersey cows in early lactation. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9: 1534-1538.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Kabak YB**, Güvenç T, Kul O, Deniz A, Gülbahar MY. Kanguruda (*Macropus spp.*) sistemik toksoplazmozis. IV. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 29 Ekim- 02 Kasım 2008, Antalya.
2. Karayığit MO, Yarim M, Şirin S, **Kabak YB**, Gülbahar MY. Bir köpekte lenf yumrusu metastazlı insülinoma olgusu. IV. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 29 Ekim- 02 Kasım 2008, Antalya.
3. **Kabak YB**, Karayığit MO, Yardımcı C, Güvenç T, Yarim M, Gülbahar MY. Buzağıda konjenital nörofibromatozis. V. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 14- 18 Eylül 2010, Mudanya- Bursa.

4. Onuk B, Kabak M, Gülbahar MY, **Kabak YB**, Yılmaz B, Karayığit MO, Gültiken EM. Gerze horoz ve tavuklarında larynx, trachea ve syrinx'in anatomik yapısının belirlenmesi. VI. Ulusal Veteriner Anatomi Kongresi, 16- 19 Eylül 2010, Afyon.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Gulbahar MY, Kabak M, Yarim M, Guvenc T, **Kabak YB**, Karayigit MO. Persistent cloaca, fused kidneys, female pseudohermaphroditism, and other anomalies in a simental calf. European Society of Veterinary Pathology, 25th Annual Meeting, 29 August- 1 September 2007, Munich- Germany.
2. Yarim M, Gulbahar MY, Guvenc T, Harada N, **Kabak YB**, Karayigit MO. Aromatase expression in the cerebellum of dogs infected with canine distemper virus. European Society of Veterinary Pathology, 25th Annual Meeting, 29 August- 1 September 2007, Munich- Germany.
3. Guvenc T, Gulbahar MY, Yarim M, **Kabak YB**, Karayigit MO. Expression of alpha basic crystalin in canine mammary tumours. European Society of Veterinary Pathology, 25th Annual Meeting, 29 August- 1 September 2007, Munich- Germany.
4. Guvenc T, Ozak A, Gulbahar MY, Yarim M, **Kabak YB**, Karayigit MO. Metatatic salivary gland adenocarcinoma in a dog. European Society of Veterinary Pathology, 26th Annual Meeting, 17- 21 September 2008, Dubrovnik- Croatia.
5. Yarim M, Gulbahar MY, Ozak A, Guvenc T, Nisbet O, **Kabak YB**, Karayigit MO. Mangal adenocarcinoma in a budgerigar (*Melopsittacus undulates*). European Society of Veterinary Pathology, 26th Annual Meeting, 17- 21 September 2008, Dubrovnik- Croatia.
6. Gulbahar MY, Guvenc T, Yarim M, Parlak U, **Kabak YB**, Karayigit MO. The role of heat shock proteins in the pathogenesis of myocarditis associated with foot-and-mouth disease virus type O in lambs. European Society of Veterinary Pathology, 26th Annual Meeting, 17- 21 September 2008, Dubrovnik- Croatia.

7. Gulbahar MY, **Kabak YB**, Karayigit MO, Yardimci C, Yarim M, Guvenc T, Nisbet O. Myxoid liposacoma in a cat. European Society of Veterinary Pathology, 27th Annual Meeting, 9-12 September 2009, Krakow- Poland.
8. Yarim M, Gulbahar MY, Guvenc T, **Kabak YB**, Karayigit MO. Ki67 expression in the cerebellum of dogs with distemper. European Society of Veterinary Pathology, 27th Annual Meeting, 9-12 September 2009, Krakow- Poland.
9. Yarim M, Gulbahar MY, Nisbet O, **Kabak YB**, Karayigit MO, Gacar A. Ossifying pilomartcoma in a dog. European Society of Veterinary Pathology and European Collage of Veterinary Pathologies, 28th Annual Meeting, 8- 11 September 2010, Belgrade- Serbia.

Projeler

1. Patolojik ve moleküler tanı teknikleri ile *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun belirlenmesi (OMÜ BAP VET-036 2006)
2. Vincristin nedenli periferik neuropatide myelin ilişkili glikoprotein (MAG) ve mikrotubul ilişkili glikoprotein 1B'nin (MAP1B) yeri. (OMÜ BAP T-511 2007)
3. Deneysel testis torsiyonu sonrası (iskemi/reperfüzyon) fare testisinde E-selektin ekspresyonu. (OMÜ BAP VET-057 2008)
4. Deneysel olarak artritis oluşturulan ratlarda n- asetil sistein ve resveratrolün akut faz yanıtı etkisinin araştırılması. (OMÜ BAP VET-055 2008)
5. Permetrinin subletal dozunun rat substantia nigra dopaminerjik nöronlar üzerine etkisi. (PYO.VET.1901.09.004)
6. Distemper virusu ile doğal olarak enfekte köpeklerin serebellumunda indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu. (PYO.VET.1901.10.001)
7. Karayaka koyunlarda hücrel prion protein dağılımının ve genotiplerinin belirlenmesi. (TAGEM/HS/10/08/02/165)

VI. Diğer Bilgiler

1. Uygulamalı Stereolojik Metotlar Kursu, 11Mart- 29 Nisan 2004, SAMSUN
2. II.Uygulamalı Deneysel Cerrahi Kursu, 29- 30 Kasım 2007, ANKARA



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HEK/ 11

27/02/2007

Konu : Araştırma projeniz hk.

Prof. Dr. M.Yavuz GÜLBAHAR

Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

2007/04 numaralı **“Ratlarda Deneysel Subkronik Bakır Zehirlenmesinin Patolojik ve Metabolik Etkilerinin İncelenmesi.”** konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu’nun **30.01.2007** tarihli toplantısında görüşülmüş, Eksiklikler bulunmuştur. **20.02.2007** yazınıza cevaben eksiklikler tamamlanmış olup Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılar ait olmak kaydıyla 6 aylık Rapor verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Muhlise ALVUR
Hayvan Etik Kurulu Başkanı