

## Sıçanlarda deneysel bakır zehirlenmesinde karaciğer ve böbrek dokularında apoptozisin belirlenmesi\*

Yonca Betil KABAK, M.Yavuz GÜLBAHAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kurupelit, Samsun.

**Özet:** Bu çalışmada deneysel olarak bakır zehirlenmesi oluşturulan sıçanların karaciğer ve böbrek hücrelerinde hücre ölümünün araştırılması amaçlandı. Çalışmada 56 adet erkek, erişkin, Sprague-Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Her grupta 14 adet sıçan olmak üzere iki deneme ve deneme grupları için ayrı ayrı iki kontrol grubu oluşturuldu. Bakır sülfat solüsyonu I. deneme grubundaki sıçanlara günlük 75 mg/kg dozda ve 14 gün süreyle, II. deneme grubundakilere ise aynı dozda 28 gün süreyle gastrik sonda ile uygulandı. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi ile kan- serum bakır düzeyi incelendi. I. deneme grubunda serum bakır düzeyinin II. grup ve kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlendi. Histopatolojik incelemede, hepatosellüler dejenerasyon, portal mononükleer hücre infiltrasyonu ve hepatositlerde nekroza rastlandı. I. deneme grubunda hepatosellüler dejenerasyonun daha şiddetli, II. deneme grubunda ise nekrotik hücrelerin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti. Her iki deneme grubunda böbreklerde korteks ve kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda dejenerasyon ve fokal lenfosit infiltrasyonu görüldü. Apoptozisi göstermek için TUNEL yöntemi ve kaspaz -3, -8, -9 aktiviteleri immunohistokimyasal olarak incelendi. Sonuçta her iki deneme grubunda karaciğer ve böbrekte hücrelerin hem apoptozis hem de nekroz ile ölebildiği, ancak her iki organda da I. deneme grubunda apoptotik hücrelerin, II. deneme grubunda nekrotik hücrelerin sayısının daha fazla olduğu görüldü. I. deneme grubunda hepatositlerin hem içsel hem de dışsal yollarla apoptozise uğrarken, böbrek tubulus epitellerinin içsel yolu kullandığı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, bakır, kaspaz, nekroz, toksikasyon, TUNEL.

### Determination of apoptosis in liver and kidney tissues in experimental copper toxicity in rats

**Summary:** In this study, we aimed to investigate cell death in liver and kidney cells of rats which were exposed to experimental copper toxicity. In the study, 56 adult, male, Sprague-Dawley rats 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 copper sulfate solution was orally administered to the rats in the first and the second experimental groups for 14 and 28 days, respectively. Blood-serum copper level was examined by Atomic Absorption Spectrophotometer. As a result, the serum copper level of the first experimental group is determined to be higher than both the second experimental group and the control groups. Histopathological results exhibit hepatocellular degeneration, portal mononuclear cell infiltration and necrotic hepatocytes at random locations in the liver of rats both from the first and the second experimental groups. Hepatocellular degeneration observed in the first experimental group was more severe, while the number of necrotic cells in the second experimental group was appeared to be higher. For both experimental groups, degeneration in corticomedullary tubus, renal cortex and focal lenfocyte infiltration were observed. TUNEL method and caspase -3, -8, -9 activities were examined immunohistochemically were used to show apoptosis. The examination revealed that liver and renal cells of both experimental groups necrosis or apoptosis. When both organs were observed, it was seen that apoptotic cells were predominant in the first experimental group while necrotic cells were predominant in the second experimental group. From this observation, it was concluded as liver undergoes to apoptosis with both intrinsic and extrinsic routes in the first experimental group while kidney tends only to intrinsic route.

Key words: Apoptosis, copper, necrosis, toxicity, TUNEL

### Giriş

Bakır; pek çok hücrenel enzim fonksiyon yapabilmesi için gerekli iz elementlerden biridir. Mitokondrial enerji üretiminde etkili olan bakır, demir homeostazisi, serbest radikallerin detoksifikasyonu, kollojen ve elastinin çapraz bağ oluşturması, nörotransmitter

sentezi gibi hücre fizyolojisi için önemli olan birçok enzimin kimyasında katalitik bir kofaktördür (14,11,32, 36,18).

Bakır elektrik ve boya sanayinde, tesisat borularının üretiminde kullanılmaktadır. Bakır tuzları veteriner hekimlikte antelmintik olarak, tarımda fungusit olarak

\* Bu çalışma, ilk yazarın (OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü) "Ratlarda deneysel bakır zehirlenmesinde patolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar" isimli doktora tezinin bir bölümüdür.

geniş kullanım alanına sahiptir (15,9). 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 (9). Bakır, memelilerin dokularında birikebilen ve dokulardaki konsantrasyonu kritik değerlere ulaştığında toksik etkiler gösterebilen bir metaldir. Bu metale maruz kaldığında başta karaciğer ve böbrek olmak üzere, pek çok dokuda patolojik değişiklikler geliştiği bildirilmektedir (11,20).

Apoptozis fizyolojik ya da patolojik koşullarda gözlenen, başladıktan sonra hızlı gelişen ve genler tarafından düzenlenen, morfolojik değişikliklere dayanan biyolojik bir fenomendir (17). Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozisi kontrol eden genler, kaspaz (caspase) olarak bilinir. Bunlar sistein proteazlarıdır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar (21). Apoptozisin mitokondriye bağımlı içsel yolunda, mitokondri membranının etkilenmesi sonucu Bcl-2 ailesi proteinleri prokaspaz-9'u aktifleştirirken, reseptör bağımlı dışsal yolda hücre zarındaki reseptörler aracılığı ile prokaspaz-8 aktive edilir (13,22,37,2). Apoptozisin içsel yolunda kaspaz-9, dışsal yolunda ise kaspaz-8 aracılığı ile ortak yoldaki kaspaz-3 aktive edilerek hücre apoptoza götürülür (22,37).

Fazla bakır serbest oksijen radikallerinin üretimini tetikleyerek mitokondrial membranda lipid peroksidasyonuna neden olurlar (28,4,35,31,27,34). Buna bağlı olarak mitokondri membran geçirgenliğinin bozulup matriksteki eriyebilir bileşiklerin ve  $Ca^{+2}$ 'un sitoplazmaya salınması sonucu osmotik basıncın artarak mitokondrinin su alıp şişmesine, sitokrom-c'nin sitosole salınmasına ve kaspaz-9'un aktive olmasına yol açar (13,33). Bakır zehirlenmesi oluşturulan sıçanların hepatositlerinde serbest oksijen radikallerinin artarak TNF $\alpha$ 'yı indükleyip kaspaz-3'ü aktive ettiği bildirilmiştir (25).

Fazla bakırın hepatositlerin lizozomlarında ve ilerleyen dönemlerde çekirdeğinde birikerek lizozomların yırtılması sonucu lizozomal enzimler ile ve/veya çekirdeğin parçalanması sonucu hücrenin nekrozuna neden olduğu da bildirilmektedir (3).

Karaciğer bakır metabolizmasının gerçekleştiği organdır. Bu nedenle bakırın en önemli hedef organı karaciğer, daha sonra böbrektir (6). Bakır hepatositlerin çekirdek ve lizozomlarında biriktikten sonra hepatositlerin hasar görmesi sonucu serbest kalarak kana geçer ve kanda filtrasyon sırasında böbrek tubullus epitelleri tarafında resorbe edilerek sitoplazmalarında birikmektedir (9,12,5,7,8,1). Farklı yollarla bakır zehirlenmesi oluşturulan deney hayvanı ya da hücre kültüründe apoptozisin araştırıldığı çalışmalara rastlanmaktadır. Buna karşın, farklı sürelerde bakır zehirlenmesi oluşturulan sıçanların karaciğer ve böbrek hücrelerinde apoptozisin hangi yol ya da yollarla indüklendiğini tam olarak ortaya konamamıştır. Bu çalışmada farklı sürelerde yüksek

düzeyde bakır verilen sıçanların karaciğer ve böbrek hücrelerinde apoptozisin hangi yol ya da yollarla indüklendiği TUNEL ve immunohistokimyasal yöntem ile araştırılmıştır.

## Materyal ve Metod

Çalışmada 56 adet erkek, erişkin, Sprague-Dawley ırkı sıçan (ortalama ağırlıkları  $280 \pm 50$  g), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK 2007-11) izin alınarak kullanıldı. Her grupta 14 adet sıçan olmak üzere iki deneme ve her deneme grubu için iki kontrol grubu oluşturuldu. Zehirlenme bakır sülfat ( $CuSO_4$ ) (SIGMA Lot 69H0127) ile 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 olan 300 mg/kg dikkate alınarak yapıldı. Distile su ile 30 mg/ml dozunda hazırlanan  $CuSO_4$  solüsyonu deneme grubundaki sıçanlara günlük 75 mg/kg olacak şekilde hesaplanarak ve I. deneme grubundaki sıçanlara 14 gün, II. deneme grubundakilere ise 28 gün süreyle gastrik sonda kullanılarak verildi. Kontrol gruplarındaki sıçanlara ise deneme gruplarında olduğu gibi ağırlıklarına göre hesaplanan distile su günlük olarak gastrik sonda ile verildi. Bu süreler sonunda derin anestezi altında kalpten kanları alındıktan sonra sıçanlar ötenazi edildi. Daha sonra sistemik nekropsileri yapılarak karaciğer ve böbrek dokuları alındı, dokular rutin yöntemle takip edildikten sonra 3-5  $\mu m$  kalınlığında kesitler alınarak Rodanin ve hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı.

*Serum bakır konsantrasyonu:* Deneme süresi sonunda alınan kanlar 1 saat oda ısısında bekletildikten sonra, 3500 devirde 15 dakika santrifüj edilip serumları ayrıldı. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) (GBC Avanta SIGMA) ile bakır için hazırlanan 0.5, 1, 2, 3, 4 ppm'lik standartlar ve blank (kör) çözeltiler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Güven aralığı 0.9998 olarak hesaplandı. Daha sonra serum örnekleri iki katı sulandırılarak üç defa ölçümü yapıp ortalaması alındı. Sonuçlar sulandırma oranlarına göre iki ile çarpıldıktan sonra  $\mu g/dl$ 'ye çevrildi.

*Serum bakır konsantrasyonunun değerlendirilmesi:* Serum AAS 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.

*Immunohistokimya (İHK):* Dokulardaki apoptozisi göstermek için Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği, ticari kitle (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) öngörülen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikor olarak aktif caspase-3 (CPP32) (Diagnostic Biosystem) (sulandırma oranı 1/25), aktif caspase-8 (FLICE) (Diagnostic Biosystem) (sulandırma oranı 1/25) ile aktif caspase-9 (LAP6 Ab-4) (Thermo Scientific) (sulandırma oranı 1/100) kullanıldı. Negatif

kontrol olarak dokulara PBS (pH 7.4), pozitif kontrol olarak primer antikörlerin üretici firmalarının önerdiği kontrol dokularına primer antikörler uygulandı.

*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL):* Dokulardaki apoptotik hücreleri belirlemek üzere TUNEL yöntemi uygulandı. Bunun için In Situ Cell Death Detection, POD (Roche Diagnostics) apoptozis kiti kullanıldı ve kitte formalinde fiske edilmiş, parafine bloklanmış dokular için öngörülen standart prosedür uygulandı.

İHK ve TUNEL yöntemi uygulanan 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 yapıldı. Karşıt boyamalar için, AEC substrat ile boyananlarda Gill's hematoksilen, DAB ile boyanan kesitlerde ise Harris hematoksilen kullanıldı.

#### *İHK ve TUNEL sonuç değerlendirmeleri:*

İmmunohistokimyasal olarak dokulardaki TUNEL ve aktif kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 aktiviteleri ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse E600W ve 20'lik objektif) boyanma yoğunluğuna bakılmaksızın boyanan hücrelerin sayısı dikkate alınarak; 0= Boyanma yok, 1= Hafif (%1-5), 2= Orta (%5-10), 3= Şiddetli (%10'dan fazlası) 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.

### **Bulgular**

Çalışmada kullanılan sıçanlara ait serumların bakır analiz sonuçlarının istatistik değerlendirmeleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Kan bakır düzeyleri açısından I. deneme grubu ile I. kontrol grubu, II. deneme grubu ile II. kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu ( $p<0.01$ ), I. deneme grubunda serum bakır düzeyinin II. deneme grubuna göre daha yüksek olduğu ve deneme grupları arasındaki farkın istatistik olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).

*Histopatolojik bulgular:* Mikroskopik olarak, I. deneme grubundaki sıçanların karaciğerlerinde II. deneme grubundakilere göre daha yaygın sentrilobuler hepatosellüler dejenerasyon ve portal bölgelerde lenfositlerin çoğunlukta bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 1a). II. deneme grubunda karaciğerlerde karyolitik çekirdekli fokal nekroz alanlarının daha geniş yer kapladığı dikkati çekti (Şekil 1b). Her iki deneme grubundaki böbreklerin korteksinde distal ve proksimal tubul epitellerinde hafif şiddette dejenerasyon ve nekroz (Şekil 1c) yanında, kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda hidropik dejenerasyon ile interstisyel dokuda fokal lenfosit infiltrasyonu görüldü.

Bakır için yapılan rodanin boyamasında, I. deneme grubundaki sıçanların hepatositlerinde safra kanalıkları boyunca, granüler tarzda ve genelde periportal bölgelere doğru daha yoğun bakır birikim gözlemlendi (Şekil 1d). II. deneme grubunda ise boyanma I. deneme grubundakilere göre daha hafif, ya hücre kümelerinin safra kanalıkları boyunca ya da tek tük hücrelerin sitoplazmasında granüler tarzdaydı (Şekil 1e). Böbrekte rodanin boyamasında I. deneme grubunda üç, II. deneme grubunda beş olguda, bazı proksimal konvolut tubul epitellerinin sitoplazmasında ya da lümenlerinde granüler tarzda bakır birikimi dikkati çekti (Şekil 1f). Kontrol gruplarına ait karaciğer ve böbrek dokularında ise boyanma gözlenmedi.

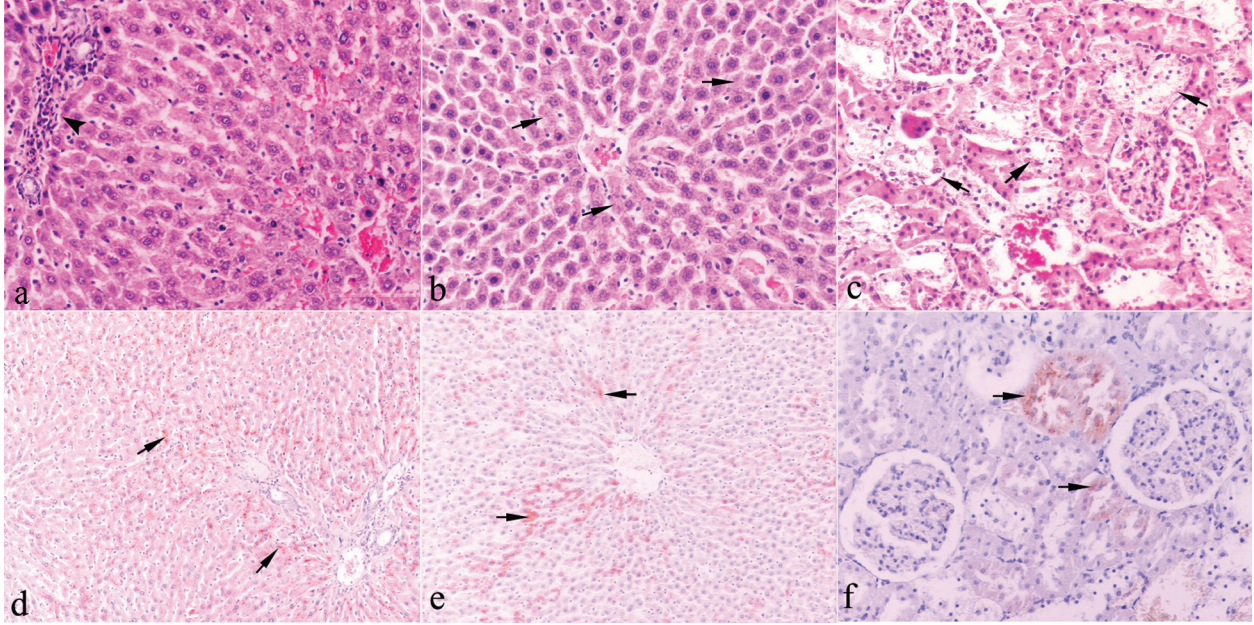
*İmmunohistokimyasal bulgular:* Deneme ve kontrol gruplarındaki sıçanların karaciğer ve böbreklerine kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 antikörleri ve TUNEL metodu ile yapılan boyama sonuçlarının istatistik değerlendirmesi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Karaciğerlerde kaspaz-9 immunoreaktivitesi I. deneme grubunda özellikle sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde gözlenirken, II. deneme grubunda tek tük hepatositte gözlemlendi (Şekil 2a-b). Kontrol gruplarında ise boyanma olmadı. Kaspaz-8 immunoreaktivitesi I. deneme grubunda genellikle sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde gözlenirken (Şekil 2c) II. deneme grubunda ve kontrol gruplarında gözlenmedi. Kaspaz-3 ile I. deneme grubunda az sayıda hepatositte ve bazı sinüzoidal hücrelerde (Şekil 2d), II. deneme grubunda sadece bazı sinüzoidal hücrelerde pozitif boyanma gözlenirken kontrol gruplarında boyanma olmadı. Böbreklerde I. deneme grubunda korteks ve kortikomedullar bölgelerde bazı distal tubulus epitelleri ile

Tablo 1: Grupların istatistik değerlendirmeleri ile birlikte serum Cu değerleri (n=7)  
Table 1: The values of serum Cu according to groups with statistical evaluations (n=7)

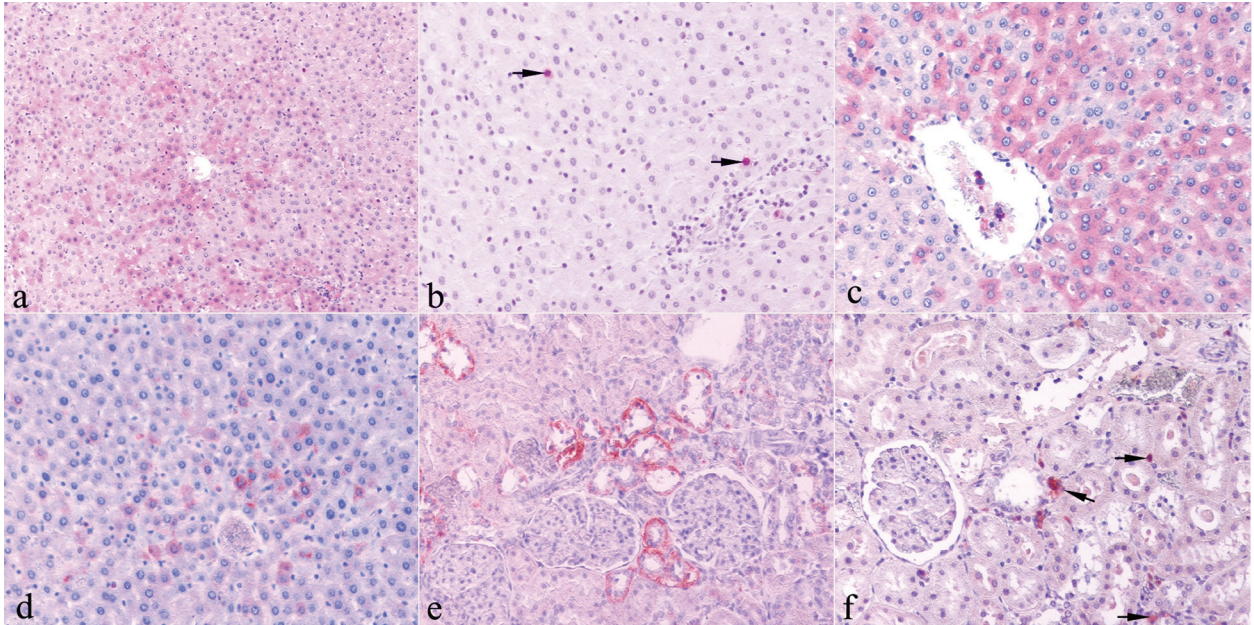
	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	%95 Güven aralığında alt ortalama değer	%95 Güven aralığında üst ortalama değer	En düşük düzey	En yüksek düzey
I.Deneme Grubu	202.28 <sup>a</sup>	72.00	27.21	136.69	269.87	124	313
I.Kontrol Grubu	105.85 <sup>bc</sup>	8.85	3.34	97.66	114.05	96	116
II.Deneme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

<sup>abc</sup>: Aynı sütunda aynı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasında fark yoktur ( $p<0.05$ )



**Şekil 1.** A) Sentrilobuler hepatosellüler dejenerasyon ve portal bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başı), I. deneme grubu, HE, X160. B) Hepatosellüler dejenerasyon ve nekrotik hücreler (oklar), II. deneme grubu, HE, X160. C) Proksimal tubulus epitellerinde dejenerasyon ve nekroz (oklar), HE, X160. D) Hepatositlerin safra kanalcıkları boyunca bakır birikimi (oklar), I. deneme grubu, Rodanin, X80. E) Hepatositlerde bakır birikimi (oklar), II. deneme grubu, Rodanin, X80. F) Proksimal tubul epitellerinde bakır birikimi (oklar), I. deneme grubu, Rodanin, X320.

**Figure 1.** A) Centrilobular hepatocellular degeneration and mononuclear cell infiltration in the portal area (arrow head), First experimental group, HE, X160. B) Hepatocellular degeneration and necrotic cells (arrows), Second experimental group, HE, X160. C) Degeneration and necrosis (arrows) in the proximal tubular epithelium, HE, X160. D) Copper deposition through the bile canaliculus of hepatocytes (arrows), First experimental group, Rhodanine, X80. E) Copper deposition in the hepatocytes (arrows), Second experimental group, Rhodanine, X80. F) Copper deposition in the proximal tubular epithelium (arrows), First experimental group, Rhodanine, X320.



**Şekil 2.** A) Hepatositlerde aktif kaspaz-9 pozitif reaksiyon, I. deneme grubu, ABC, X80. B) Karaciğerdeki birkaç hepatositte aktif kaspaz-9 pozitif reaksiyon (oklar), II. deneme grubu, ABC, X160. C) Hepatositlerde aktif kaspaz-8 pozitif reaksiyon, I. deneme grubu, ABC, X160. D) Hepatositlerde aktif kaspaz-3 pozitif reaksiyon, I. deneme grubu, ABC, X160. E) Tubulus epitellerinde aktif kaspaz-9 pozitif reaksiyon, I. deneme grubu, ABC, X160. F) Az sayıda tubulus epiteline ve interstisyel bölgedeki bazı hücrelerde aktif kaspaz-9 pozitif reaksiyon, II. deneme grubu (oklar), ABC, X160.

**Figure 2.** A) Active caspase-9 positive reaction in the hepatocytes, First experimental group, ABC, X80 B) Active caspase-9 positive reaction in a few hepatocytes (arrows), Second experimental group, ABC, X160. C) Active caspase-8 positive reaction in the hepatocytes, First experimental group, ABC, X160. D) Active caspase-3 positive reaction in the hepatocytes, First experimental group, ABC, X160. E) Active caspase-9 positive reaction in the tubular epithelium, First experimental group, ABC, X160. F) Active caspase-9 positive reaction in few tubular epithelium and some interstitial cells (arrows), Second experimental group, ABC, X160.

Tablo 2: Grupların İHK ve TUNEL metodu sonuçlarının istatistiki değerlendirmesi (n=14).

Table 2: The value of the result of IHC and TUNEL method to groups with statistical evaluations (n=14)

Organlar	Çalışma Grupları	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9	TUNEL
Karaciğer	I. Deneme Grubu	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
	II. Deneme Grubu	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
	Kontrol Grubu	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	1 <sup>b</sup>
Böbrek	I. Deneme Grubu	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
	II. Deneme Grubu	2 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>
	Kontrol Grubu	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>

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)

her iki deneme grubunda interstisyel bölgede tek tük hücre kaspaz-9 ile pozitif boyandı (Şekil 2e-f). Kaspaz-8 immunoreaktivitesi I. deneme grubunda kortekste çok az sayıda distal ve proksimal tubul epitelinde dikkati çekti. Ancak II. deneme grubu ve kontrol gruplarında boyanma olmadığı gözlemlendi. Kaspaz-3 immunoreaktivitesi her iki deneme grubunda çok az sayıda proksimal ve distal tubulus epitellerinde, ilave olarak I. deneme grubunda bazı Henle kulpu epitellerinde gözlenirken kontrol grubunda kortekste tek tük tubulus epitellerinde dikkati çekti.

TUNEL metodu ile I. deneme grubunda daha fazla olmak üzere karaciğerde hepatositlerde, böbrekte ise özellikle distal daha az sayıda proksimal tubul epitellerinde, ayrıca bazı Henle kulpu epitellerinde pozitif reaksiyon gözlemlendi. Kontrol gruplarına ait bazı karaciğerlerde az sayıda hepatositte, böbrekte ise tek tük distal ve proksimal tubulus epitelleri ile glomerular yumak içerisinde bazı hücrelerde pozitif boyanmalara rastlandı.

Karaciğere kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz-3 antikoları ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar ve TUNEL metodu sonuçlarına göre, I. deneme grubunda pozitif boyanan hücre sayısı II. deneme grubu ve kontrol grubuna göre daha fazlaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p>0.05).

Böbrekte kaspaz-9 pozitif hücre sayısına göre I. deneme grubu ile II. deneme grubu ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken (p>0.05), kaspaz-3 pozitif hücre sayısı açısından I. deneme grubu ile II. deneme grubu arasındaki fark anlamsız, ancak deneme grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p>0.05). TUNEL metodunda pozitif hücre sayısı ise deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemsiz ancak deneme grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel önem göstermiştir (p>0.05).

### Tartışma ve Sonuç

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 (11,20).

Bakırın organizmadan atılımında esas yol safradır. Hepatositlerde biriken fazla bakırın safrayla atılmaya başlamasının ardından safradaki konsantrasyonunun plazmadakinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (10). Buna göre sunulan çalışmada II. deneme grubunda serum bakır konsantrasyonunun I. deneme grubuna göre daha düşük olması bu dönemde bakırın safrayla daha fazla atıldığını göstermektedir.

Bakır zehirlenmesinde karaciğerde daha önceki çalışmalarda tanımlanan hepatositlerde parankim dejenerasyonu ve periportal bölgelerde lenfositlerin çoğunlukta bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonu özellikle I. deneme grubunda en çok göze çarpan bulgulardandı (12,1,16). Bakır zehirlenmesinde hepatositlerin nekroz ve apoptozise uğradığı bildirilmektedir (12,1). I. deneme grubunda nekrotik hepatositler yanında apoptotik hepatositler, II. deneme grubunda ise nekroz alanları daha yaygındı. Bakır hepatositlerin çekirdek ve lizozomlarında biriktikten sonra hepatositlerin hasarına neden olup serbest kalarak kana geçer ve filtrasyon sırasında böbrek tubulleri tarafından resorbe edildiği ileri sürülmektedir (9,5,7,8,1,10). Böbreklerde Haywood ve ark. (1985)'nin sonuçlarına benzer olarak, konvolut distal tubul epitelleri yanında kortikomedullar bölgedeki tubuluslarda da parankim dejenerasyonu ve nekroz gözlemlendi. Bu bulgular bakır zehirlenmesinde böbreğin de etkilendiğini göstermektedir.

Bakır diğer toksik metallerde olduğu gibi oksidatif strese neden olmaktadır (4). Oksidatif stres arttığında hücrelerin apoptozise uğradığı bilinmektedir (13,29). Hücrede normal şartlarda mitokondride hücresel solunum sırasında az miktarda serbest oksijen radikalleri üretilirken, lizozomlarda bakır biriktiğinde bu organel tarafından serbest oksijen radikallerinin üretiminin arttığı ve üretilen serbest oksijen radikallerinin ana hedefinin mitokondri olduğu ileri sürülmüştür (25,23,24,26). Serbest oksijen radikalleri, mitokondri permeabilitesini ya da transmembran potansiyelini bozarak veya matriksten Ca<sup>+2</sup> un sitosole salınmasına neden olarak etkilerini gösterirler (13,29,30). Sinerjistik etkiye sahip olan serbest

oksijen radikalleri ve  $Ca^{+2}$ , mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına, organelin su alıp şişmesine ve sitokrom c'nin sitosole salınmasına neden olarak apoptozisin içsel yolu olan kaspaz-9'u ve devamında kaspaz-3'ü aktive ettiği ileri sürülmektedir (13,30). Diğer taraftan toksik metaller nedeniyle fazla üretilen serbest oksijen radikallerinin TNFR ve Fas reseptörleri aracılığıyla kaspaz-8'i aktive ettiği de bildirilmiştir (3). Ancak sunulan çalışmada karaciğerde I. deneme grubunda kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz-3 immunopozitifken, II. deneme grubunda sadece birkaç hepatosit kaspaz-3 ile pozitif reaksiyon vermiş, TUNEL yöntemi ile I. deneme grubunda daha fazla sayıda hücrenin apoptozise uğradığı belirlenmiştir. Bu veriler I. deneme grubunda hepatositlerin nekroz yanında apoptozisin hem içsel hem de dışsal yollarını kullanırken, II. deneme grubunda hepatositlerin nekroz ile öldüğünü göstermektedir. Dördüncü haftadan itibaren göreceli olarak hepatositlerde nekrozun daha fazla görülmesi Fuentealba ve Haywood (1988)'un bakır zehirlenmesi oluşturdukları ratlarda yaptıkları ultrastruktural çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen bulgular uzun süre bakıra maruz kalan sıçanlarda karaciğerde bakıra karşı tolerans geliştiği yönündeki hipotezi de doğrulamaktadır (9).

Toksik metallerin böbreklerde reabsorbe edildikleri yer olan proksimal konvolut tubul epitellerinde fonksiyon bozukluğuna ve glomeruluslarda hasara neden olduğu bilinmektedir (30). I. deneme grubunda çok sayıdaki tubulus epitelinde kaspaz-9 ekspresyonu yanında tek tük epitelde kaspaz-8 ekspresyonu, II. deneme grubunda ise az sayıdaki tubulus epitelinde kaspaz-9 ve kaspaz-3 ekspresyonunun gözlenmesi bakır zehirlenmesinde hücrelerin çoğunlukla içsel yolla apoptozise gittiği şeklinde yorumlanabilir. Böbrekte tubulus epitellerinde kaspaz-9'un pozitif olması, literatürde belirtildiği gibi serbest oksijen radikallerinin çeşitli yollarla apoptozisin içsel yolunu uyarmasıyla açıklanabilir (9). TUNEL yöntemi sonuçları ise karaciğerde olduğu gibi böbrekte de I. deneme grubunda apoptozisin daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak; uzun süre bakıra maruz kalan sıçanların karaciğerinde bakıra karşı tolerans gelişebildiği, I. deneme grubunda karaciğerde hepatositler hem içsel hem de dışsal yollarla apoptozise uğrarken, böbrek tubulus epitellerinin genellikle içsel yol ile apoptozise gittiği, II. deneme grubunda ise her iki organda da nekroza daha fazla rastlandığı belirlendi. Elde edilen bulgulara göre bakır zehirlenmesinde dokularda gözlenen apoptozisin içsel ve dışsal yollarını tetikleyen protein ve reseptörlerin daha ayrıntılı ve farklı metotlarla çalışılması gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından VET.066 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

1. **Aburto EM, Cribb AE, Fuentealba IC, Ikede BO, Kibenge FSB, Markham F** (2001): *Morphological and biochemical assessment of the liver response to excess dietary copper in Fischer 344 rats*. Can J Vet Res, **65**, 97-103.
2. **Chipuk JE, Green DR** (2008): *How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?* Trends Cell Biol, **18**, 157-164.
3. **Fong RN, Gonzalez BPE, Fuentealba IC, Cherian MG** (2004): *Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats*. Toxicol Appl Pharm, **200**, 121-130.
4. **Formigari A, Irato P, Santon A** (2007): *Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects*. Comp Biochem Phys, **146**, 443-459.
5. **Fuentealba IC, Haywood S, Trafford J** (1987): *Evaluation of histochemical methods for the detection of copper overload in rat liver*. Liver, **7**, 277-282.
6. **Fuentealba IC, Haywood S** (1988): *Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. I. Ultrastructural changes in the liver*. Liver, **8**, 372-380.
7. **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*. Exp Mol Pathol, **50**, 26-37.
8. **Fuentealba IC, Davis RW, Elmes ME, Jasani B, Haywood S** (1993): *Mechanisms of tolerance in the copper-loaded rat liver*. Exp Mol Pathol, **59**, 71-84.
9. **Geberding JL** (2004): *Toxicological profile for copper*. U.S. Department of Health and Human Service. Atlanta, Georgia.
10. **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.
11. **Harris E** (2003): *Basic and clinical aspects of copper*. Crit Rev Cl Lab Sci, **40**, 547-586.
12. **Haywood S, Loughran M, Batt RM** (1985): *Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. intracellular localization of copper in the liver and kidney*. Exp Mol Pathol, **43**, 209-219.
13. **Kannan K, Jain S** (2000): *Oxidative stres and apoptosis*. Pathophysiol, **7**, 153-163.
14. **Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T** (2000): *Klinik Biyokimya*. 1. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
15. **Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A** (2002): *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. 2.Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
16. **Ke B, Llanos RML, Mercer JFB** (2008): *ATP7A transgenic and nontransgenic mice are resistant to high copper exposure*. J Nut, **138**, 693-697.
17. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR** (1972): *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. Brit J Cancer, **26**, 239-257.
18. **Langner C, Denk H** (2004): *Wilson Disease*. Virchows Arch, **445**, 111-118.
19. **Linder MC, Hazegh-Azam M** (1996): *Copper biochemistry and molecular biology*. Am J Clin Nutr, **63**, 797-811.

20. **Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY** (2007): *Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases*. *Physiol Rev*, **87**, 1011–1046.
21. **Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR** (1998): *Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future*. *Trends Genet*, **14**, 410–416.
22. **Mirkes PE** (2002): *2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development*. *Teratology*, **65**, 228–239.
23. **Pourahmad J, Ross SJ, O'Brien P** (2001): *Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu but not Cd*. *Free Radical Bio Med*, **30**, 89–97.
24. **Pourahmad J, O'Brien P, Jokar F, Daraei B** (2003): *Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes*. *Toxicol in Vitro*, **17**, 803–810.
25. **Pulido MD, Parrish AR** (2003): *Metal-induced apoptosis: mechanisms*. *Mutat Res*, **533**, 227–241.
26. **Rana SVS** (2008): *Metals and apoptosis: recent developments*. *J Trace Elem Med Biology*, **22**, 262–284.
27. **Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter, P, Yaffee M** (1995): *Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases*. *Biochim Biophys Acta*, **1271**, 67–74.
28. **Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR, Rotilio G** (2004): *Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance*. *Neurochem Res*, **29**, 493–504.
29. **Roy DN, 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*. *Chem-Biol Interact*, **182**, 136–147.
30. **Sabolic I** (2006): *Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals*. *Nephron Physiol*, **104**, 107–114.
31. **Saris NE, Skulski IA** (1991): *Interaction of Cu<sup>+</sup> with mitochondria*. *Acta Chem Scand*, **45**, 1042–1046.
32. **Sharp PA** (2003): *Ctr1 and its role in body copper homeostasis*. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 288–291.
33. **Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F** (2000): *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. *Apoptosis*, **5**, 415–418.
34. **Siraki AG, Pourahmad J, Chan TS, Khan S, O'Brien PJ** (2002): *Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes*. *Free Radical Bio Med*, **32**, 2–10.
35. **Sokol RJ, Devereaux M, Mierau GW, Hambidge KM, Shikes RH** (1990): *Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency*. *Gastroenterology*, **99**, 1061–1071.
36. **Tapiero H, Townsend DM, Tew KD** (2003): *Trace elements in human physiology and pathology, Copper*. *Biomed Pharmacother*, **57**, 386–398.
37. **Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN** (2005): *Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer*. *Ann Hematol*, **84**, 627–639.

Geliş tarihi: 16.05.2012 / Kabul tarihi: 15.06.2012

**Yazışma adresi:**

Dr. Yonca Betil Kabak  
 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
 Patoloji Anabilim Dalı  
 55139 Kurupelit- SAMSUN  
 e-mail: ybkabak@omu.edu.tr