



Koyunlarda premiks kaynaklı bakır zehirlenmesinin klinik, patolojik ve toksikolojik incelenmesi

Mehmet Tuzcu¹, Özgür Özdemir², Zeynep Çelik^{3*}, Yavuz Ulusoy⁴, Rabia Salik⁵, Bahadır Kılınç⁶, Muhammed Öner⁷, Osman Dağar⁸, Gökhan Akçakavak⁹, Selçuk Pekkaya¹⁰, Adem Tarakci¹¹

^{1,2,3,5,7,8} Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji AD, Konya, Türkiye

^{4,6} Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Patoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

⁹ Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji AD, Yozgat, Türkiye

^{10,11} Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Biyokimya Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 11.10.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 22.11.2022

Özet: Bakır zehirlenmesi, bakırın vücuda alınımı ve atılımı arasındaki dengesizlikten kaynaklanan patolojik bir durumdur. Akut zehirlenme genellikle antihelmintik ilaçlar, mineral karışımları veya aşırı miktarda çözünür bakır tuzlarının uygulanmasından sonra görülür. Sunulan bu çalışmanın materyalini 900 toklu oluşturmaktadır. Hasta hayvanlarda abdominal sancı, ishal, hemoglobinüri, ikterus ve ölüm bulunmaktaydı. Yapılan nekropsiler sonucu deri altı yağ dokusu, serozalar ve organların etrafındaki yağ dokuda şiddetli sarılık belirlendi. Karaciğerin koyu kahve ya da sarımtırak renkte ve kolay parçalandığı görüldü. Safra keseleri dolgun, safra koyu renkte ve granüler yapıdaydı. Böbreklerin oldukça şişkin ve koyu siyah renkte olduğu görüldü. İdrar keseleri hemoglobiniyeye bağlı olarak koyu kırmızı renkte idrar içermekteydi. Histopatolojik muayenede hepatositlerde hidropik dejenerasyon, vakuoler dejenerasyon, yağlanma, multifokal nekrozlar ve dissosiasyon, hepatositlerin sitoplazmasında sarı kahve renkte granüllerin yanı sıra hepatosit sitoplazmaları ve safra kanalcıklarında sarımsı-yeşil renkte safra pigmentlerine rastlandı. Portal alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonları ile safra kanalı artışı belirlendi. Karaciğer kesitlerine Rodaninle yapılan boyamalarda hepatositlerin sitoplazmalarında kırmızımsı renkte pozitif boyanmalar tespit edildi, Böbreklerde tubul epitellerinde şişkinlik ve vakuoler dejenerasyon, bilirubin pigmenti dikkati çekti. Sunulan bu çalışmada koyunlarda görülen ve yem katkısından kaynaklandığı belirlenen akut bakır zehirlenmesinin klinik, toksikolojik ve patolojik bulgularının ortaya konulması ve son yıllarda oldukça sık karşılaşılan yem katkısi kaynaklı zehirlenme olaylarına dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakır, Histopatoloji, Koyun

Clinical, pathological and toxicological investigation of premix-induced copper poisoning in sheep

Abstract: Copper poisoning is a pathological condition resulting from an imbalance between the uptake and excretion of copper. Acute poisoning is usually observed after administering anthelmintic drugs, mineral mixtures, or excessively soluble copper salts. The material of the present study consists of 900 yearling sheep. Sick animals had abdominal pain, diarrhea, hemoglobinuria, icterus, and death. As a result of the necropsies, severe icterus was determined in the subcutaneous adipose tissue, serosas, and adipose tissue around the organs. It was observed that the liver was dark brown or yellowish and easily disintegrated. The gallbladders were full, the bile was dark in color and granular. It was observed that the kidneys were quite swollen and dark black. The urinary bladders contained dark red urine due to hemoglobinuria. Histopathological examination revealed hydropic degeneration, vacuolar degeneration, steatosis, multifocal necrosis, and dissociation in hepatocytes, yellowish-brown granules in the cytoplasm of hepatocytes, as well as yellowish-green bile pigments in the hepatocyte cytoplasm and bile ducts. Mononuclear cell infiltration and bile duct increase were determined in portal areas. In the staining of liver sections with Rodanin, positive staining in reddish color was detected in the cytoplasm of hepatocytes. Swelling and vacuolar degeneration in the tubular epithelium in the kidneys and bilirubin pigment were noted. This study it is aimed to reveal the clinical, toxicological, and pathological findings of acute copper poisoning in sheep, which is determined to be caused by feed additives and to draw attention to feed additive poisoning events that have been encountered quite frequently in recent years.

Keywords: Copper, Histopathology, Sheep

Yazışma adresi / Correspondence: Zeynep Çelik, Selçuk Üniversitesi Alaeddin Keykubat Yerleşkesi Veteriner Fakültesi
PK:42003 Selçuklu/Konya e-posta: zeynep.celik@selcuk.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-3118-1054 • ²0000-0002-1595-0557 • ³0000-0002-9667-5728 • ⁴0000-0001-6942-5013 • ⁵0000-0002-0364-697X • ⁶0000-0003-3426-2116 • ⁷0000-0001-5905-1062 • ⁸0000-0003-2209-7512 • ⁹0000-0001-5949-4752 • ¹⁰0000-0002-8291-9592 • ¹¹0000-0002-1470-2674

Giriş

Bakır zehirlenmesi, bakırın vücuda alınımı ve atılımı arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ve karaciğerde biriken Cu'nun karaciğer hücrelerinde hasara neden olduğu patolojik bir durumdur (Nederbragt ve ark. 1984). Bakır metabolizmasını değiştiren birçok faktör, bakırın emilimini veya tutulmasını artırarak bakır zehirlenmesine neden olabilir. Diyet ile alınan bakır miktarının artması veya safra yoluyla atılımının azalması temel nedenler olarak bilinir, ancak insanlardaki Wilson hastalığında olduğu gibi genetik faktörler de bakır zehirlenmesinin ortaya çıkışında etkili olabilir (Nederbragt ve ark. 1984). Bu durumla benzer şekilde Suffolk, Texel, Charrollais, Bluefaced Leicester gibi ırklar genetik olarak bakır toksikasyonuna daha duyarlıyken, Merinos ırkının dayanıklı olduğu, ancak yine de bakır toksikasyonuna rastlandığı bildirilmiştir (Woolliams ve ark. 1982). Dünyanın birçok yerinde akut veya kronik bakır zehirlenmesine rastlanmaktadır. Akut zehirlenme nadiren görülmekle beraber, genellikle antihelmintik ilaçlar, mineral karışımları veya yanlış formüle edilmiş rasyonlar ile birlikte aşırı miktarda çözünür bakır tuzlarının uygulanmasından sonra görülür. Kronik bakır zehirlenmesi ise primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer kronik toksikasyon en sık koyunlarda, uzun süre ve aşırı miktarda bakır alındığında görülürken, sekonder kronik toksikasyonda ise hasarlı bir karaciğer veya karaciğer hasarına neden olan *Heliotropium europaeum*, *Senecio* spp. ve *Echium plantagineum* gibi bitkilerin sürekli alımı sonucu meydana gelir (Kerr ve McGavin 1991). Sekonder kronik toksikasyonda alınan bakır miktarı fazla olmasa da anormal karaciğer metabolizması nedeniyle bakır birikimi meydana gelir (Anchordocuy ve ark. 2017). Karaciğerdeki Cu miktarının 150 mg/kg'dan az olması, kandaki Cu miktarının ise 80-120 mg/dL sınırları arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Blakley 2021). Akut zehirlenme genellikle, koyun ve genç buzağılarda 20-100 mg/kg, olgun sığırlarda 200-800 mg/kg bakır alımını takiben ortaya çıkar. Koyunlarda kronik zehirlenme, 15-20 ppm (kuru madde) bakır ve düşük molibden içeren meraların otlatılmasında, günlük 3,5 mg/kg bakır alımıyla ortaya çıkabilir (Kerr ve McGavin 1991). Hayvanların otladığı meyve bahçelerinde bakır içeren pestisitler ve mantar öldürücüler, nehir ve akarsulardaki endüstriyel bakır atıkları kritik kaynaklardır (Kerr ve McGavin 1991). Diğer türler de duyarlı olmasına rağmen koyunlar en sık etkilenir ve genç koyunlar toksisiteye daha fazla duyarlıdır.

Akut bakır zehirlenmesi, karın ağrısı, ishal veya koyu yeşilimsi renkte ve mukozaya parçaları içeren dışkı, kaşeksi, dehidrasyon ve şok ile karakterize, abomazumda erozyon ve ülserasyon gibi ciddi bir gastroenteritise neden olur. Hayvan gastrointestinal hastalıktan kurtulsa da çoğunlukla üçüncü günden sonra hemoliz ve hemoglobüri gelişir ve akut toksikasyondan kurtulan hayvanlar, sonrasında gelişen böbrek yetmezliğinden ölür (Cutlip 1988). Kronik zehirlenmede, hayvanlardaki belirtiler arasında depresyon, uyuşukluk, halsizlik, nefes darlığı, dehidrasyon, kaşeksi, hemoglobüri ve sarılık bulunur (Pugh ve Baird 2012). Sarılık, 24 saatten daha fazla hayatta kalan hayvanlarda gelişir. Hemolitik krizden birkaç gün veya hafta önce, ALT ve AST dahil olmak üzere karaciğer enzimleri genellikle artar. Sürü morbiditesi genellikle <5%'tir, ancak etkilenen hayvanların genellikle %75'inden fazlası 1-2 gün içinde ölmektedir. Şişkin, koyu gri-siyah renkli böbrekler, şarap renginde idrar ve koyu kahverengi-siyah parankimi olan genişlemiş bir dalak hemolitik krizin sonucudur (Gupta 2018). Karaciğer büyümüş ve kolay parçalanabilir kıvamdadır. Histolojik olarak, sentrilobüler hepatitis ve renal tübüler nekroz vardır (Haywood ve ark. 2008).

Sunulan bu çalışmada koyunlarda görülen ve yem katkısından kaynaklandığı belirlenen akut bakır zehirlenmesinin klinik, toksikolojik ve patolojik bulgularının ortaya konulması ve son yıllarda oldukça sık karşılaşılan yem katkısı kaynaklı zehirlenme olaylarına dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali

Çalışmanın materyalini Konya bölgesinde yetiştirilen 4000 koyunluk bir sürüdeki 780'i klinik hasta ve 120 tanesi ölmüş olmak üzere 900 toklu oluşturdu. Hasta toklulardan kan serumu, plazma örnekleri ve kan frotileri alındı. Ölen hayvanlardan 3 tanesinin nekropsisi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, 8 tanesinin nekropsisi de işletmede Etlik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü uzmanlarınca yapıldı. Bu hayvanlardan alınan karaciğer, böbrek, akciğer, dalak ve kalp gibi iç organlardan alınan örnekler patolojik inceleme için alındı. Ayrıca, karaciğerden toksikolojik incelemeler için de örnek alındı. Kan bakır seviyelerinin belirlenmesi için hasta koyunlardan 12 adet plazma örneği, virolojik ve bakteriyolojik muayeneler için 12 adet kan serumu örneği ve parazitolojik muayeneler için de 12 adet perifer kan frotileri ile otopsi sırasında dalak ve böbreklerden tuşe preparatları alındı.

Histopatolojik inceleme

Histopatolojik inceleme için organlardan alınan doku örnekleri %10 formol içinde tespit edildikten sonra rutin doku takip prosedürleri (Leica TP 1020) uygulandı (Luna 1968). Elde edilen parafin bloklarından 5 mikron kalınlığında kesitler alındı (Leica RM-2125 RT). Daha sonra alınan bu kesitlere hematoksilen-eozin boyama uygulandı (Luna 1968). Preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile incelendi, fotoğrafları çekildi (Olympus EP50).

Levaditi Boyama

%10'luk formalin solüsyonu tespitini takiben 2 mm inceliğinde trimlenen doku örnekleri, 2 saat süreyle çeşme suyunda yıkandı. % 96'lık alkolde 24 saat süreyle tutulduktan sonra dokular, distile suda kabın dibine çökünceye kadar bekletildi. Örnekler daha sonra yeni hazırlanmış %3'lük gümüş nitrat solüsyonu içine konuldu ve 37°C'de karanlık bir ortamda 4 gün boyunca solüsyon yenilenecek şekilde bekletildi. Bu sürenin sonunda, örnekler distile sudan geçirilerek durulandı. Karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 2 gün indirgeme solüsyonunda bekletildikten sonra tekrar distile suda durulanan dokular, %80, %96'lık alkol ve absolut alkollerin her birinde 30 dakika ve iki ksilol kabında birer saat tutularak dehidre edildi. İki kez yenilenen sedir yağında 30'ar dakika süreyle bekletilen dokular 45'er dakika süreyle iki kez değişimi yapılan yumuşak parafinde tutuldu. Parafine gömüldükten sonra 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri, ksilollerden geçirilerek deparafinize edildi ve üzerleri lamelle kapatıldı (Luna 1968). Preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile incelendi.

Bakır Boyama

Karaciğer kesitlerinde bakırın ortaya konulması için ticari Wilson Disease Stain boyama kiti (Katolog No: 04-182807) kullanılmıştır. Boyama kit prosedürüne uygun olarak aşağıda verilen şekilde yapılmıştır.

100 ml coplin kavonozuna 80 ml distile su, 2 ml reagent A, 2 ml reagent B, 40 damla reagent C eklendi. Cam çubuk ile karıştırılıp rhodanın solüsyonu hazırlandı. Karaciğer, böbrek ve dalaktan alınan kesitler hazırlanan rhodanın solüsyonuna koyulup 56°C etüvde 3 saat bekletildi. Bu süre sonunda distile su ile durulanan kesitlerin üstüne 10'ar damla reagent D eklendi ve 3 dakika etki etmesi için bekledi. Akan musluk suyunda iki dakika mavileştirilip, alkol ile dehidre edildikten sonra ksilen ile temizlendi ve entallen ile kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile incelendi.

Kimyasal Analizler

Yemlerde ve karaciğer dokusunda bakır düzeyleri ve plazma bakır düzeylerinin belirlenmesinde Laur ve ark. (2020) tarafından yayımlanan metot kullanılmıştır.

Karaciğer dokusu ve serum örneklerinde Cu analizi ve yem örneklerinde Cu analizleri ICP-MS yöntemi ile yapılmış olup Agilent 7700x® ICP-MS cihazı kullanılmıştır (N.M.L.K.186 2007). Örnekler mikro dalga çözündürme tekniği kullanılarak Berghof Microwave® sistemi ile analize hazırlanmıştır (Anon 2004). Numunelerin hazırlanması aşamasında tartım işlemlerinde Radwag® hassas terazi, ultra saf su temininde Elga Purelab® ultra saf su sistemleri, çalışma standartları ve numunelerin hazırlanmasında %65 Nitrik Asit (Merck Suprapur® %65 HNO₃ Darmstadt-Germany), %30 Hidrojen Peroksit (Merck® %30 H₂O₂ Darmstadt-Germany), Bakır standardı (High-Purity® 1000mg/L), internal standart için ⁴⁵Sc ve ¹⁰³Rh (Agilent Technologies® ICP-MS standart mix solution) kullanılmıştır.

Yem, karaciğer dokusu ve plazma örnekleri Gutwerk ve Krämer (2005) mikrodalga çözündürme metodu ile çalışılmıştır. Metot basınca dayanıklı kapalı teflon polimer kaplar içinde yüksek ısı, basınç ve yüksek asit ortamda mikrodalga etkisi ile organik matriksin çözündürülmesi ve elementlerin asit matrikste serbest kalması prensibine dayanır. Çalışılan örneklerde ısı-basınç-süre hesaplamaları için Berghof Microwave® standart yazılımı kullanılmıştır.

Alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda ALT enzim düzeyleri kolorometrik metotla Beckman Coulter marka AU640 model otoanalizörde ticari sıvı reaktifler kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular

Klinik Bulgular

Sürünün genelinde abdominal sancı ile birlikte mukuslu bir ishalin bulunması dikkat çekti. Hastalanan toklularda başlangıçta vücut ısısının yüksek olduğu belirlenirken, vücut ısısının düşmesi ve nabzın artmasıyla birlikte kollaps ve ölümün şekillendiği görüldü. Bazı hayvanlar yüzüstü pozisyonda yatar vaziyette ve boyun yana bükülmüş haldeydi (Resim 1A). İştahsızlık, susuzluk, hemoglobüri, mukozalarda solgunluk ve ikterus (Resim 1B) dikkat çeken klinik bulgular arasındaydı.



Resim 1. A. Yüzüstü yatar pozisyonda ve boynun yana bükülmüş görünümü. B. Mukozalarda ikterik görünüm (ok).

Alınan kan serumlarının biyokimyasal analizlerinde 4-15 U/L sınırları arasında olması gereken ALT enzim düzeyi ortalamasının artarak 427 ± 42 U/L olduğu belirlendi.

Hazırlanan perifer kan frotilerinin ve otopsi sırasında dalak ve böbrekten alınan tuşe preparatların giemsa ile boyamalarının mikroskopik incelenmesinde kan parazitlerine rastlanmadı.

Toksikolojik bulgular

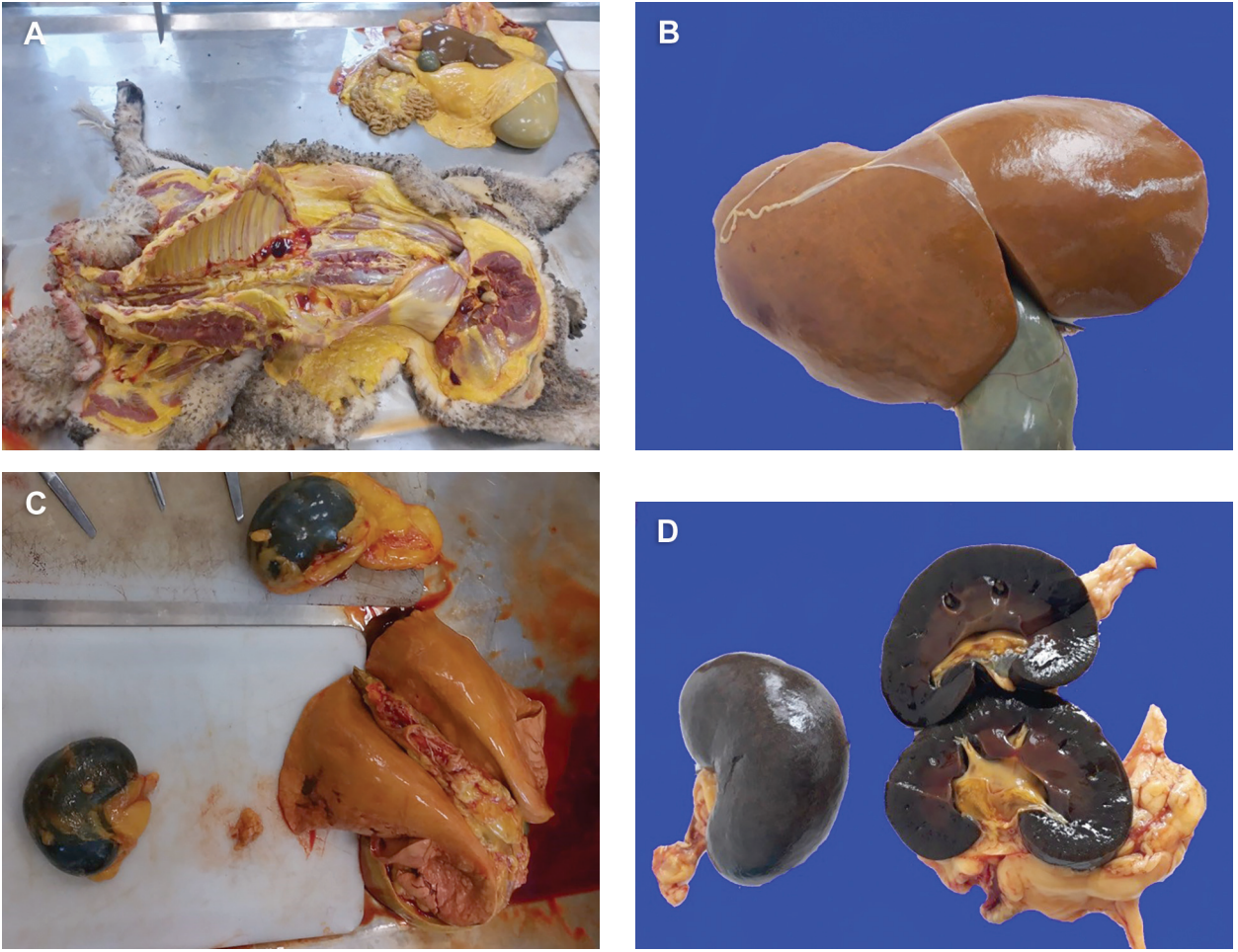
Alınan karaciğer örneklerinde Cu miktarının belirlenmesine yönelik yapılan analizlerde ölçülen bakır değeri, Blakley (2021)'in belirttiği gibi 150 mg/kg dan küçük olması gerekirken karaciğerlerde belirlenen Cu seviyesi ortalamasının artarak $163,63 \pm 8,60$ mg/kg olduğu belirlendi.

Yine alınan kan örneklerinde Cu miktarının belirlenmesine yönelik yapılan analizlerde ölçülen bakır değeri Blakley (2021)'in belirttiği gibi 80-120 mg/dL sınırları arasında olması gerekirken kan örneklerinde belirlenen Cu seviyesi ortalamasının artarak $157,8 \pm 11,6$ mg/dL olduğu belirlendi.

İşletmeden alınan yemlerin Cu seviyesi analizlerinde rasyon için kullanılan kesif yemde bakır seviyesi ortalaması $3,3 \pm 0,78$ mg/kg olarak belirlenmiştir bu seviye yemlerde bulunmasına müsaade edilen 15 mg/kg seviyesinden düşüktür. Rasyonlara ilave edilen yem katkılarının eklenmesi ile hazırlanan günlük rasyondan alınan örneklerde ise Cu ortalaması birinci örnekte de $34,1 \pm 1,18$ mg/kg ikinci örnekte de $28,6 \pm 1,38$ mg/kg olarak bulunmuştur.

Makroskopik Bulgular

Makroskopik muayenede deri altı yağ dokusu ve serozalarla beraber organların etrafındaki yağ dokuda şiddetli sarılık dikkati çekti (Resim 2A). Karaciğerin gevrek kıvamda, koyu kahve ya da sarımtırak renkte, büyümüş ve kolay parçalandığı belirlendi. Safra keseleri dolgun, safra koyu renkte ve granüler yapıdaydı. Böbreklerin oldukça şişkin ve koyu siyah renkte olduğu görüldü (Resim 2B). İdrar keseleri hemoglobüriye bağlı olarak koyu kırmızı renkte idrar içermekteydi. Dalaklar büyük, koyu renkte ve yumuşak kıvamdaydı.



Resim 2. A. Karkasta ve organların serozalarında şiddetli sarılık. **B.** Karaciğer oldukça şişkin ve gevrek kıvamı, kolay parçalanabilir yapıda, solgun sarımsı renkte ve safra kesesi dolgun görünümde. **C-D** İç organların serozalarında ve etrafını saran yağlarda şiddetli sarılık, böbrekler koyu siyah renkte.

Mikroskopik Bulgular

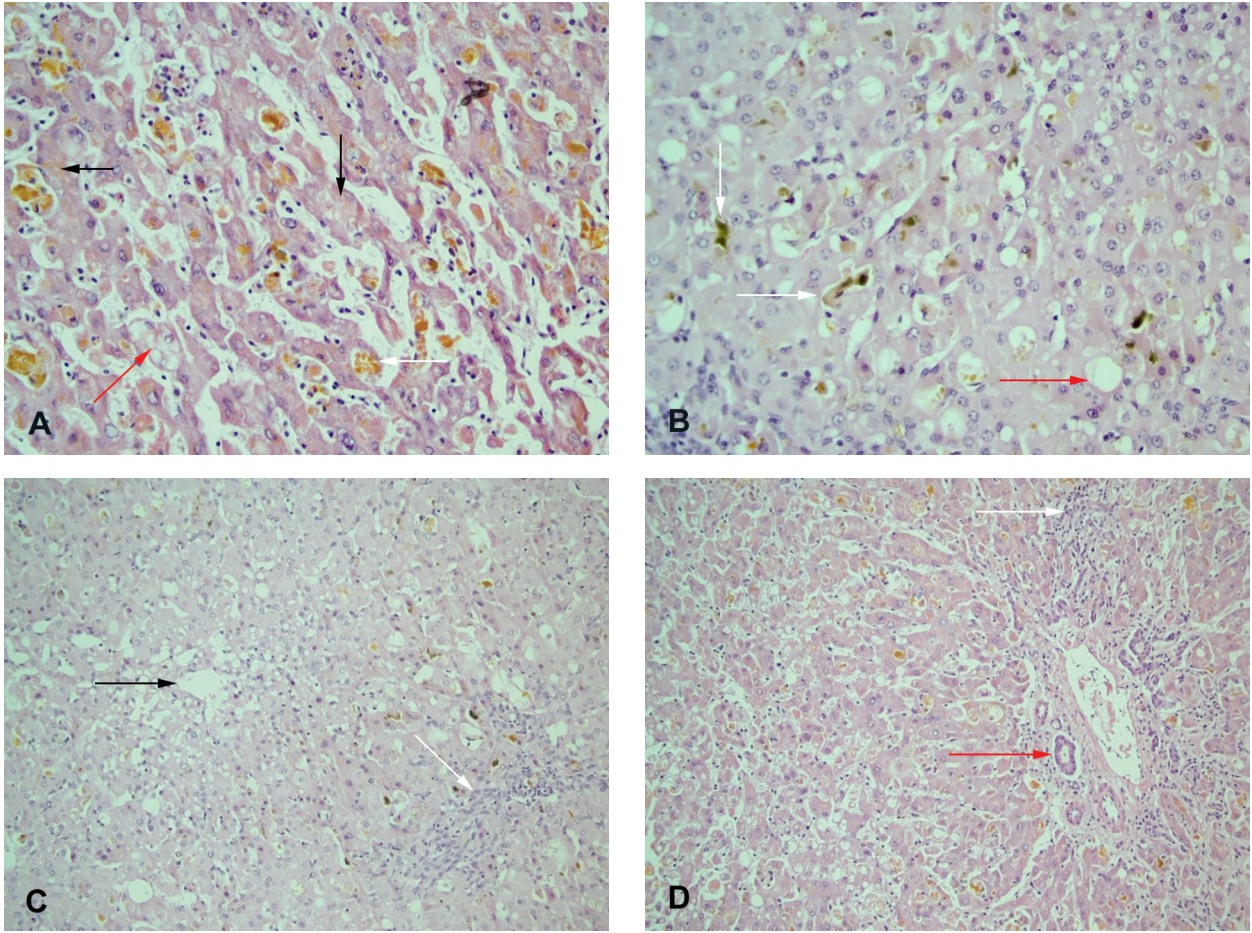
Histopatolojik olarak, hepatositlerde hidropik dejenerasyondan, vakuoler dejenerasyona kadar değişen değişikliklerle birlikte yağlanma (Resim 3A-B), fokal nekrozlar (Resim 3C) ve dissosiasyon görüldü. Ayrıca hepatositlerin stoplazmasında sarı kahve renkte granüllerin (Resim 3A) yanı sıra hepatosit sitoplazmaları ve safra kanalcıklarında sarımsı-yeşil renkte safra pigmentlerine (Resim 3B) rastlandı. Portal alanlarda lenfositlerin ağırlıkta olduğu mononükleer hücre infiltrasyonları ile safra kanalı artışı belirlendi (Resim 3D).

Böbreklerin mikroskopik incelenmesinde tubul epitellerinde şişkinlik, yer yer vakuoler dejenerasyon belirlendi (Resim 4A). Tubul lümenlerinin genişlediği ve silindirler ile dolu olduğu belirlendi (Resim 4B-C).

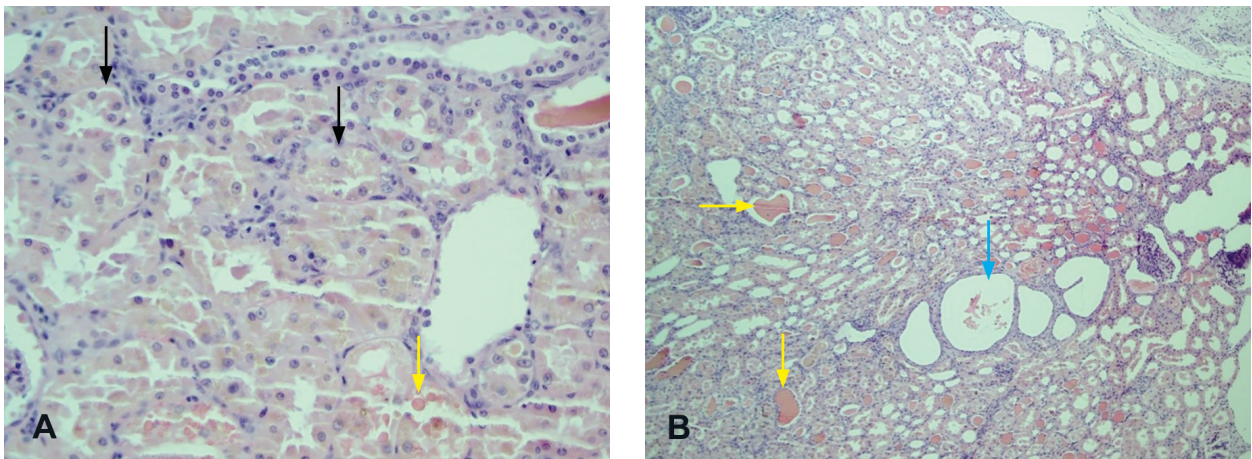
Tubul epitellerinde sarımsı-yeşilimsi renkte (bilirubin) pigmenti dikkati çekti (Resim 4D).

Akciğerlerde interalveoler alanlarda kalınlaşma, alveol epitellerinde kübikleşme ve bazı bronşiolerin etrafında yerleşmiş mononükleer hücre infiltrasyonları belirlendi. Kalplerin mikroskopik incelenmesinde kaslarda hafif derecede sitriasyon kaybı belirlendi.

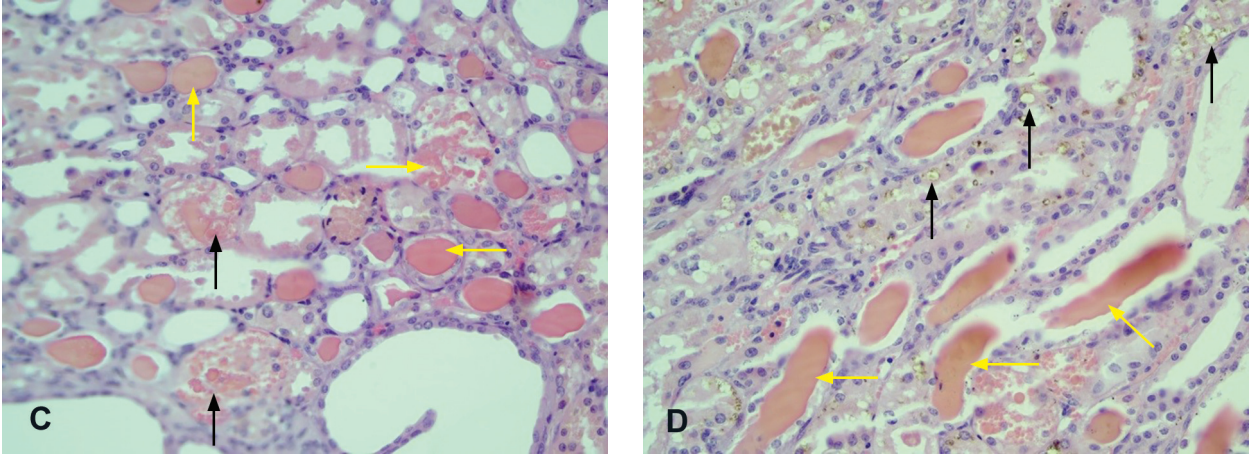
Karaciğer kesitlerine Rodaninle yapılan boyamalarda (Wilson Disease Stain) hepatositlerin sitoplazmalarında kırmızımsı renkte çoğunlukla granüler yapıda bazen de yoğun boyalı yuvarlak kalın nokta görünümündeki pozitif boyanmalar bakır birikimleri olarak tespit edildi (Resim 5 A-B). Benzer boyanmalara böbrekte de rastlandı. Leptospira yönünden yapılan Levaditi boyama negatif sonuç vermiştir.



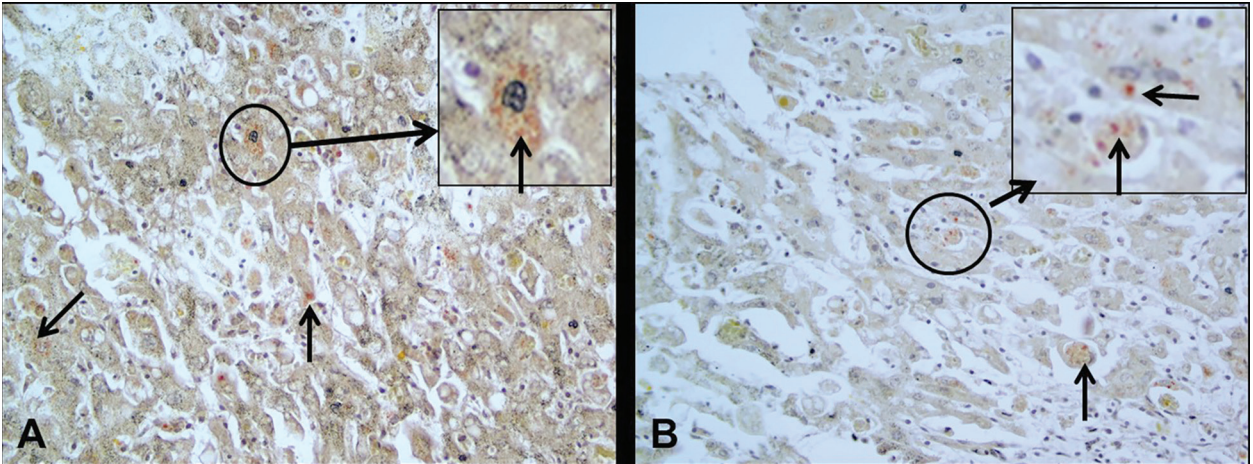
Resim 3. Karaciğerde patolojik değişiklikler. HxE. A-B. Hepatositlerde şişkinlik ve sitoplazmada kahverengi ganüller (siyah ok) ve safra kanalcıklarında safra pigmenti birikimleri (beyaz ok) ve yağlanma (kırmızı ok). X400. C-D. Hepatositlerde yağlanma ve dissosiasyon ve fokal nekrozlar (siyah ok) ile portal alanda mnh infiltrasyonu (beyaz ok) ve safra kanalı artışı (kırmızı ok). X200.



Resim 4. Böbrekler, HxE. **A.** Tubul epitellerinde şişkinlik, vakuoler dejenerasyon (siyah oklar) ve hiyalin damlacıkları (sarı ok). **B.** Tubul lümenlerinde genişleme (mavi ok), lümenlerde hiyalin silindirleri (sarı oklar) ve epitellerde hiyalin damlacıkları (siyah oklar).



Resim 4. C. Tubul lümenlerinde genişleme (mavi ok), lümenlerde hiyalin silindirleri (sarı oklar) ve epitellerde hiyalin damlacıkları (siyah oklar). **D.** Medullada tubul lümenlerinde hiyalin silindirleri (sarı oklar) ve tubul sitoplazmalarında yeşilimsi pigment (safra) (siyah oklar).



Resim 5. Karaciğerde bakır birikimleri (oklar), Rodanin (Wilson Disease Stain) boyası, x400, küçük resimler rodanin pozitif boyanma, digital büyütme.

Tartışma ve Sonuç

Literatürde de belirtildiği gibi koyunlar bakır zehirlenmelerine oldukça duyarlıdır. Bakır zehirlenmesi bakır metabolizmasını etkileyen birçok faktör olması nedeniyle karmaşık bir problemdir. Bakır zehirlenmesinde çevresel kimi faktörlerin de etkisi vardır. Alınan yemde molibden ve sülfatların durumu, meralarda spesifik bitkilerin bulunması ve alınan besinlerdeki protein düzeyi zehirlenmede önem kazanır (Moeller 2004; Gupta 2012). Akut bakır toksikasyonu yüksek dozda eriyebilir bakır tuzlarının alımıyla beraber meydana gelir. Sığır, at, domuz ve kümes hayvanları nisbi olarak bakır zehirlenmesine karşı dirençli hayvanlardır. Domuz rasyonlarında kuru madde bazında 125-250 ppm, sığır ve atlarda 50

ppm, keçilerde 10-23 ppm, kümes hayvanlarında ise 300-500 ppm bakır bulunur ve kronik toksikasyona yol açmaz (Borobia ve ark. 2022). Normalde kuzu rasyonlarında 4-6 ppm (mg/kg) bakır bulunması gerekir. Bu miktar 10 ppm üzerine çıkarsa toksikasyon oluşabilir. Ayrıca koyun yemlerinde bakır- molibden miktarlarının uygun oranda (6/1) olmaması günlük 3,5 mg/kg dozda bakır alındıktan sonra bile kronik bakır zehirlenmesi meydana getirebilir (Karademir 2006; Blakley 2021). Bu çalışmada zehirlenmenin kaynağının rasyona ilave edilen yem katkısı olduğu belirlenmiştir. Yem katkı kaynaklı bakır zehirlenmeleri daha çok sığırlar için hazırlanmış bakır miktarı yüksek ve molibden oranı düzenlenmemiş yem katkılarının bu vakada olduğu gibi koyunlarda kullanılmasına bağlı ortaya çıkmaktadır.

Molibden bakır toksikasyonunda önemli bir role sahiptir çünkü molibdenin alınan besinlerde olması gerekenden az miktarda bulunması bakırın depo edilmesini kolaylaştırır. Yine molibdenin karaciğerde bakırın depolanmasını engelleyebilmesi için yemde sülfatların yeterince bulunması gerekir. Molibden, yeterli miktarda sülfatların varlığında, bağırsakta ve karaciğerde bakır ile erimeyen bileşikler oluşturur (Moeller 2004). Rasyondaki molibden miktarının belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılamamıştır. Ancak tedavi amaçlı Gupta (2012) ile benzer şekilde sürünün tamamına hayvan başı günlük sodyum molibdat 100 mg verilmiş ve tedaviye başladıktan yaklaşık bir hafta sonra ölümler durmuştur. Elde edilen bu sonuç bakır zehirlenmesi teşhisimizi doğrulamaktadır.

Yapılan bu çalışmada belirlenen abdominal sancı, ishal, kollaps iştahsızlık, susuzluk, hemoglobünüri, mukozalarda solgunluk ve ikterus gibi klinik bulgular literatürde Pugh ve Baird (2012)'nin belirttiği bakır zehirlenmesi klinik bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Alınan kan serumlarının biyokimyasal analizlerinde 4-15 U/L sınırları arasında olması gereken ALT enzim düzeyi ortalamasının artarak 427 ± 42 U/L olduğu belirlenmiş olması karaciğer hasarının göstergelerinden biri olup histopatolojik incelemede de karaciğerdeki hasarın ortaya konulması bu durumu desteklemektedir.

Bakır toksikasyonu ile ilgili, Oruc ve ark. (2009), Cullen JM. (2015) ve Brown ve ark. (2017)'in da bildirdikleri gibi; karaciğerin büyüerek gevrek bir durum alması, renginin koyu kahve ya da sarımtırak olması, safranın koyu renkte ve granüler yapıda olması, dalağın büyük, koyu renkte ve yumuşak kıvamlı olması, böbrekler şişkin ve koyu siyahımsı renkte olması, idrarın hemoglobünüriye bağlı olarak koyu kırmızı renkte olması gibi nekrops bulguları bu çalışmada da tespit edilmiştir.

Bakır karaciğerde, hepatositlerin lizozomlarında birikir. Karaciğerde bakır yoğunluğu kuru ağırlıkta 300 ppm'e ulaştığında, bakır lizozomlarda membran bütünlüğünü bozarak hücrede yıkılmaya neden olur. Karaciğerde bakır yoğunluğu 1000 ppm'in üzerinde olan koyunlar klinik belirti göstermeyebilir ve bu durum ölen hücrelerden serbest kalan bakırın yüksek mitoz etkinliği sonu oluşan yeni hepatositler tarafından alındığı sürece devam eder. Hepatositlerdeki kayıp oranı yenilenme oranını aşarsa plazmada bakır düzeyi yükselir ve zehirlenme belirtileri ortaya çıkar (Cullen JM. 2015). Yapılan bu çalışmada da

karaciğer örneklerinde ölçülen bakır seviyesi ortalamasının $163,63 \pm 8,60$ mg/kg olduğu, kan örneklerinde bakır seviyesi ortalamasının $157,8 \pm 11,6$ mg /dL olduğu belirlendi. Çalışmada ölçülen bakır seviyeleri hem karaciğerde ve hem de plazmada kabul edilen sınır değerlerin sırasıyla 150 mg/kg, 80-120 mg/dL oldukça üstünde olması Commission (2003) ile uyumlu idi.

Bakır zehirlenmelerinde mikroskopik olarak belirlenen en karakteristik bulgunun hepatositlerin sitoplazmasında bulunan ferrik demir ve bakır kapsayan otofagolizozomların sarı esmer renkte granüller şeklinde izlenmesi olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada da literatüre benzer şekilde hepatositlerin sitoplazmalarında kahve-sarı renkli granüller belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen remark kordonlarının diziliminin bozulmuş olması, hepatositlerde belirlenen vakuoler dejenerasyonlar, hepatositlerin sitoplazmasında belirlenen yağ vakuolleri ile hepatositlerde görülen fokal nekrozlar, bakır zehirlenmesinde Oruc ve ark (2009), Cullen JM. (2015), Brown ve ark. (2017), Eroksuz ve ark (2021) tarafından rapor edilen bulgular ile uyumlu idi.

Bu çalışmada mikroskopik olarak tubul epitelinde belirlenen vakuoler dejenerasyon ile çoğu tubul epitelinde belirlenen nekrozlar, tubul lümenlerinde belirlenen silindirler ve intersitisyel dokuya yerleşmiş bilirubin pigmenti birikimleri benzer çalışmaların bulguları ile uyumlu idi.

Bu çalışmada otopsi sırasında alınan taze böbrek ve karaciğer dokularına uygulanan levaditi boyamalarının negatif bulunmuş olması olguların koyunlarda sarılıkla seyreden leptospirozisten ayrımını sağlamıştır. Yine klinik olarak hasta olan koyunlardan alınan kan örneklerinin ve otopsi sırasında dalak ve böbreklerden hazırlanan sürme preparatların kan parazitleri yönünden negatif çıkması da olguları kan parazitlerinden ayırmıştır. Ayrıca karaciğerden alınan kesitlerin bakır yönünden yapılan Wilson Disease Stain boyama bakır açısından pozitif sonuç alınmış olması bakır zehirlenmesi yönündeki teşhisimizi kesinleştirmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile koyunlarda görülen yem katkısından kaynaklanan bakır zehirlenmesinin klinik, toksikolojik ve patolojik bulgularının ortaya konularak ve son yıllarda oldukça sık karşılaşılan yem katkısı kaynaklı zehirlenme olaylarından dolayı rasyona ilave edilecek yem katkılarının formülasyonu aşamasında daha dikkatli olunması gerektiği kanısına varılmıştır.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kararları ve izinler: Tanı amacıyla getirilen hasta hayvandan rutin doku ve serum analizleri çalışıldığı için etik kurul kararı gerekmemektedir.

Kaynaklar

- Anchordoquy M, Anchordoquy J, Nikoloff N, Pascua A, Furnus, C. (2017) High copper concentrations produce genotoxicity and cytotoxicity in bovine cumulus cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 24. doi:10.1007/s11356-017-9683-0
- Anon (2004). MWS-2. Temassız Sıcaklık Ölçümüne Sahip Mikrodalga Parçalama Sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH
- Blakley BR. (2021). Copper Poisoning in Animals. Retrieved <https://www.msdsvetmanual.com/toxicology/copper-poisoning/copper-poisoning-in-animals>, from MSD Manual
- Borobia M, Villanueva-Saz S, Ruiz de Arcaute M, Fernández A, Verde MT, González JM, Navarro T, Benito AA, Arnal JL, De las Heras M, Ortín, A. (2022) Copper Poisoning, a Deadly Hazard for Sheep. *Animals*, 12(18), 2388. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/18/2388>
- Brown DL, Van Wettene AJ, Cullen JM. (2017) Hepatobiliary system and exocrine pancreas. In *Pathologic basis of veterinary disease* (pp. 412-70. e1): Elsevier.
- Commission, E. 2003. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of copper in feedingstuffs. *Health & Consumer Protection Directorate General, Directorate C—Scientific Opinions, C2 Management of Scientific Committees*, 1-47.
- Cullen JM, SM. (2015) Liver and biliary system. In M. G. Maxie (Ed.), *Pathology of Domestic Animals* (6 ed., Vol. 2, pp. 259-351): Elsevier Ltd. .
- Cutlip, R. (1988) Book Review: Jensen and Swift's Diseases of Sheep. In: SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA.
- Eroksuz Y, Incili CA, Karabulut B, Yılmaz I, Yerlikaya Z, Eroksuz H. (2021) Pathological Changes due to Copper Toxication in Two Sheep. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 35(3), p.187-89.
- Gupta R. (2018) A review of copper poisoning in animals: sheep, goat and cattle. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 3(5), 1-4.
- Gupta RC (2012) *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*: Academic press.
- Gutwerk D, Krämer R. (2005) Mikrowellenaufschlüsse steuern. *Nachrichten aus der Chemie*, 53(10), 1052-53.
- Haywood S, Paris J, Ryvar R, Botteron C. (2008) Brain copper elevation and neurological changes in north ronaldsay sheep: a model for neurodegenerative disease? *Journal of comparative pathology*, 139(4), p.252-55.
- Karademir B. (2006) Molibdenin hayvanlar için enzimsel fonksiyonları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12(2), 217-24.
- Kerr LA, McGavin HD. (1991) Chronic copper poisoning in sheep grazing pastures fertilized with swine manure. *J Am Vet Med Assoc*, 198(1), 99-101.
- Laur N, Kinscherf R, Pomytkin K, Kaiser L, Knes O, Deigner HP. (2020) ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. *PLoS one*, 15(5), e0233357.
- Luna LG. (1968) *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*.
- Moeller RB. (2004) Hepatobiliary system: Toxic response of the hepatobiliary system. *Veterinary Clinical Toxicology*, p.61-68.
- Nederbragt, H, Van den Ingh, T, Wensvoort, P. 1984. Pathobiology of copper toxicity. *Veterinary Quarterly*, 6(4), p.179-235.
- N.M.L.K.186 (2007).Nordic Committee on Food Analysis,Trace Elements As, Cd, Hg, Pb and other elements.Determination by ICP-MS after pressure digestion.
- Oruc HH, Cengiz M, Beskaya A. (2009) Chronic copper toxicosis in sheep following the use of copper sulfate as a fungicide on fruit trees. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), 540-43.
- Pugh DG, Baird NN. (2012) *Sheep & Goat Medicine-E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, Field AC, Woolliams C. (1982) The effect of breed of sire on the accumulation of copper in lambs, with particular reference to copper toxicity. *Animal Science*, 35(3), 299-307. doi:10.1017/S0003356100000969