

Tavuklarda Bakır Noksanı Diyetle Beslemenin Aorta Duvarında Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler

Mine YAKIŞIK*

Meltem ÇETİN**
Nesrin ÖZFİLİZ****

Nihat MERT***

ÖZET

Beslenmede bakır noksanlığının arteriyoskleroz oluşumu üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada, 40 adet Izobrown-Lohmann günlük civciv kullanıldı. 5 ay süreyle, en az bakır içeren ve deney grubunda bakır ilavesi yapılmamış rasyonla beslenen civcivlerin aortalarından 3., 4. ve 5. aylar sonunda alınan parçalar yapısal özellikler açısından incelendiler.

Alınan aorta örneklerinde makroskopik olarak bir değişiklik gözlenmedi. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda, aorta duvarı tunika intima katmanının kalınlaştığı, duvarı döşeyen endotel hücrelerinin kübikleştiği, endotel hücreleri arasında makrofajların bulunduğu ve endotel altında ki düz kas hücre miktarının arttığı saptandı. Tunika medyada ise, elastik membranların yer yer kopuntuya uğradıkları, elastik ipliklerin bu bölgelerde yoğunlaştığı ve membranlar arasında içleri belirsiz materyallerle dolu fokal boşlukların bulunduğu tesbit edildi.

* Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Bursa.

** Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

*** Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

**** Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Bursa.

SUMMARY

The Structural Differences on the Wall of Aorta of Chickens Fed with a Copper Deficient Diet

In this study one-day old 40 Isobrown-Lohmann breed of chicks were used to investigate the effects of copper deficiency on the formation of arteriosclerosis. Chicks were fed with a special ration for five months. The mineral mixtures of treated group had no copper whereas control group had some within their rations. Aorta samples from the chicks were taken at the end of the 3rd, 4th and 5th months and examined to determine the structural differences. There were no macroscopic changes on the aortas. The changes found at the microscopic examinations of the wall of aortas were as follow: tunica intima layer was thickened, the cells of endothelial layer became cubically shaped, macrophages were seen between the endothelial cells, amount of the smooth muscle cells beneath the endothelial layer increased, focal breaks were apparent in the elastic lamellae of tunica media and elastic fibres became danse at these areas, focal cavities contained unknown materials were present between elastic lamellae.

Key words: Wall of aorta, chicken, structural differences.

GİRİŞ

Canlı organizmada metabolik faaliyetlerin düzenli olabilmesi, normal fizyolojik fonksiyonların yapılabilmesi için karbonhidrat, lipid ve protein gibi temel besin maddelerinin yanında, vitamin ve minerallerin de besinlerle yeterli miktarda alınması zorunludur.

Bu mineral maddeler arasında bakırın önemi büyüktür. Bakır büyüme, mitokondriyal respirasyon, bağdokunun sentezi, hematopoezis ve melanin pigmentinin oluşumunda gereklidir¹. Bakır noksanlığı tavşanlarda, civcivlerde, domuzlarda, koyunlarda ve çocuklarda iskelet bozuklukları ile kendini gösterir. Bakır noksanlığına sahip civcivlerde büyüme, normale göre daha yavaştır, iskelet sisteminde bozukluklar görülebilir ve bacakların uzun kemikleri normal derecede bükülmüş ve kırılabilir haldedir^{2,3}.

Diyet bakırı, elastin sentezi üzerine, lizinin çapraz bağlı gruplara, desmozinlere çevrilmesinde esas olan bir enzimin aktivitesini düşürerek etkili olmaktadır^{4,5}. Bakır noksanlığı olan civcivlerde subkutan hemorajilerle birlikte ana damarların yırtılması sonucu gelişen ölümler görülmektedir⁶. Ayrıca rasyona ilave edilen molibdenin, bakırın plazmadan dokulara transferini inhibe ettiği öne sürülmektedir⁷.

İnsanlarda arteriyoskleroz, damarların genel biyolojik bir problemi olarak kabul edilir ve mutlak olarak hayvanlardakinden daha önemlidir. Bu konuda genellikle insanlara ilişkin çalışmalar yapılmıştır⁸.

Arteriyosklerozun nedenleri, üzerinde birçok görüş olmakla birlikte tam olarak ortaya konulamamıştır. Ateromatöz plak oluşumunun, kanda total lipid ve kolesterolün ve ayrıca kolesterol/fosfolipid oranının yüksek olmasıyla ilgili olduğu görülür. Bu faktörlerle ilgili tavşanlar, maymunlar, köpekler, domuzlar, hindiler ve diğer türlerde yapılan denemeleri, arteriyoskleroz oluşumunun nedeni henüz ispat edememiştir^{3,9}.

Arteriyosklerozun görülme oranı, çoğu hayvan türlerinde yüksek olmasına rağmen, nisbi olarak insanlardakinden düşüktür ve özellikle sağlık açısından önemsizdir. Ancak insanlardaki hastalığı anlamak için hayvan modellerinde araştırmalar yapılmaktadır^{3,10,11}.

Deneyel çalışma yapılan tüm hayvanlarda ve kuşlarda spontan olarak gelişen ateromatoz, sonuç olarak insanlardaki ile benzerlik gösterir. Örneğin, civcivlerde 6 aylıkken görülür ve bir yaşındaki tavuk ve horozlarda yaklaşık olarak % 45 insidense sahiptir¹².

Konu ile ilgili çalışmalar yapan araştırmacılar^{1,12,13,14,15} evcil hayvanlarda deneyel olarak oluşturulan arteriyoskleroz sonucunda aorta duvarında yapısal değişiklikler saptamışlardır.

Bu çalışmada, rasyonları yeterli düzeyde bakır içermeyen civcivlerde, bakır noksanlığı ile arteriyoskleroz arasındaki ilgi ve bunun sonucunda aorta duvarında meydana gelen yapısal değişiklikleri incelemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 40 adet Izobrown-Lohmann günlük civciv kullanıldı. Civcivler iki gruba ayrılarak, 5 ay süreyle en az bakır içeren yem maddeleriyle hazırlanmış rasyonla¹⁷ beslendiler. Deney grubunda rasyona ilave edilen mineral karışımından bakır çıkartılırken, yem maddelerindeki bakırın değerlendirilmesini engelleyen molibden ilave edildi. Besleme sırasında kontrol grubuna normal su verilirken, deney grubuna mineral maddeden yoksun bidistile su verildi. Kaplardan bakır geçişini önlemek amacıyla su için plastik kaplar, yem için galvaniz yemlikler kullanıldı¹⁸. Hayvanlar 5 ay boyunca çevreden izole edilmiş bir şekilde ve belirlenen aşı programlarına uyularak aşılanıp, bakıldılar.

Üçüncü ayın sonunda 5 deneme, 5 kontrol grubundan, dördüncü ayın sonunda 10 deneme, 10 kontrol grubundan ve beşinci ayın sonunda da 5 deneme, 5 kontrol grubundan civcivler kesilip aortaların kalpten çıkan ana kollarından parçalar alınarak % 10 nötr formolde tesbit edildiler. Tesbit işleminden sonra parafin bloklara alınan damar parçalarından 5-7 mikron kalınlığında enine kesitler alındı.

Alınan kesitler:

1. Damar duvarının yapısal özelliklerini ortaya koymak amacıyla Crossmann'ın üçlü boyama tekniği¹⁹ ile,
2. Damar duvarında mevcut olan elastik iplikler ve onların oluşturduğu elastik membranların belirlenmesi için, Pinkus'un Giemsa-Orcein boyama metodu²⁰ ile boyanarak incelendiler.

Kontrol ve deneme grubu aortalarının duvarını oluşturan tunika intima kalınlıkları mikrometrik oküler ile ölçüldü. Tunika mediyanın önemli oluşumları elastik membranlar sayılarak bunların aritmetik ortalamaları (\bar{x}), ortalamanın standart hataları ($S\bar{x}$) hesaplandı ve sınırları t testi ile kontrol edildi.

BULGULAR

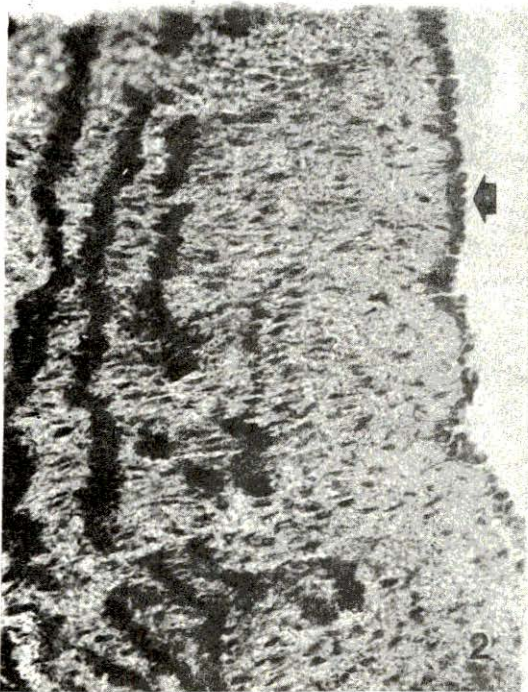
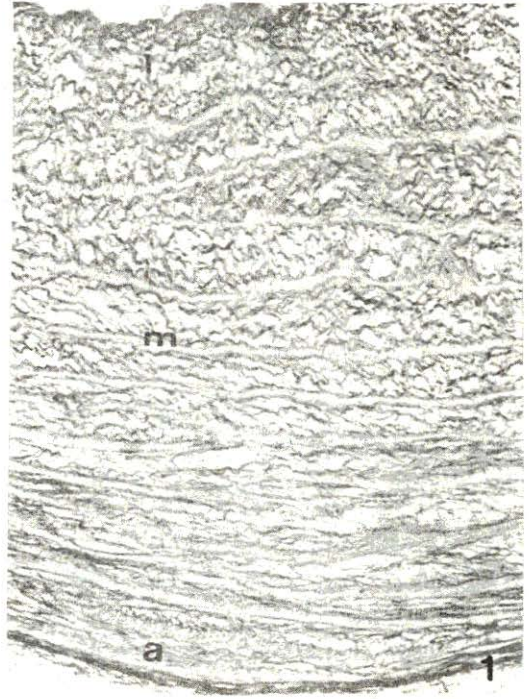
Kontrol grubunu oluşturan civcivlerin aortalarından alınıp üçlü boyama tekniği ile boyanan kesitler incelendiğinde, aorta duvarının tunika intima, tunika mediya ve tunika adventisya olmak üzere üç ana katmandan oluştuğu gözlenmiştir. Tunika intima tek katlı yassı endotel hücreleriyle döşenmiştir. Endotelin hemen altında, birkaç sıra longitudinal seyirli elastik iplikler ve bunların aralarında da az miktarda düz kas hücreleri ve fibroblastların yer aldığı belirlenmiştir. Tunika mediyanın esas yapısını sirküler seyirli elastik membranların oluşturduğu gözlenmiştir. Elastik membranların aralarında yine sirküler seyirli düz kas hücreleri ile değişik miktarlarda kollagen iplikler, fibroblastlar ve elastik ipliklerin bulunduğu saptanmıştır. Tunika adventisyanın genelde sirküler seyreden birkaç elastik fibril ve çevredeki dokuyla birleşen bir bağ doku tabakasından oluştuğu görülmüştür (Resim: 1).

Deney grubunu oluşturan civcivlerin aortalarından alınan kesitler incelendiğinde, damar duvarının kontrol grubunu oluşturan hayvanlarda olduğu gibi tunika intima, tunika mediya ve tunika adventisya olmak üzere üç ana katmandan oluştuğu gözlenmiştir. Tunika intimada görülen ilk değişiklik, endotel hücrelerinin kübikleşmeye başlamış olması (Resim: 2), ikinci değişiklik ise, endotel hücreleri arasında makrofajların görülmesidir (Resim: 3). Bunun dışında, tunika intimada endotel altında düz kas hücrelerinin sayılarında bir artış belirlenmiştir (Resim: 4).

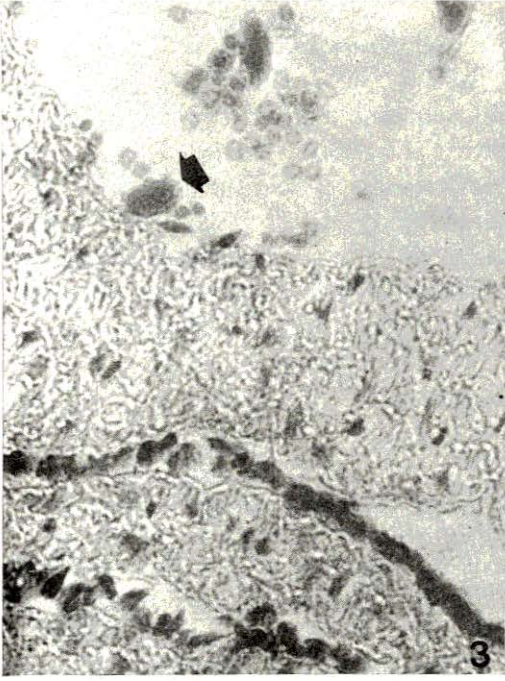
Kontrol ve deney grubunu oluşturan civcivlerin aortalarının tunika intima kalınlıkları mikrometrik oküler yardımıyla ölçülerek Tablo I'deki değerler elde edilmiştir. Bu ölçümler sonunda tunika intimanın deney grubunda kalınlaştığı ve bu kalınlaşmanın özellikle üçüncü ay sonunda kontrol grubuna göre $p \leq 0.01$ düzeyinde istatistiksel önem taşıdığı tesbit edilmiştir.

Tunika medyada bulunan elastik membranlar kontrol ve deney gruplarında sayılmış ve bu değerlendirmeler sonucunda, membran sayılarında bir farklılığın olmadığı saptanmıştır.

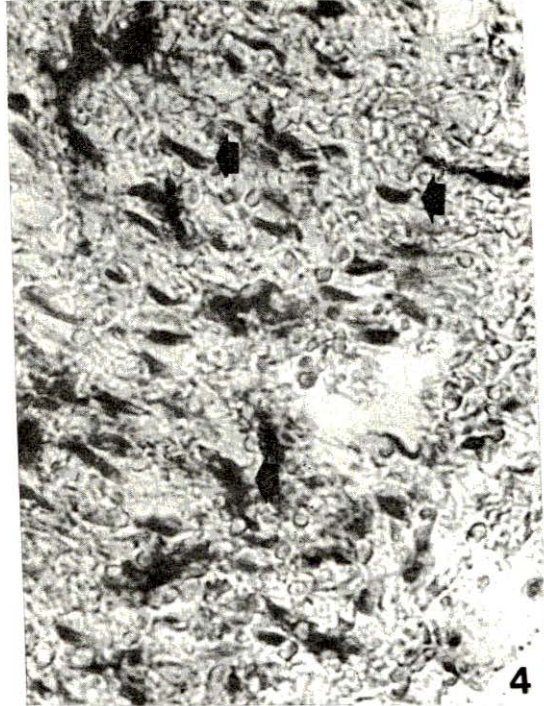
Resim: 1
Kontrol grubu civcivlerde aorta duvarı: Tunika intima(i), tunika mediya(m), tunika adventisya(a). Giemsa-Orcein.x400. (The wall of the aorta of chicks in control group: Tunica intima(i), tunica media(m), tunica adventitia(a)).



Resim: 2
Tunika intimada kübik şekilli endotel hücreleri (ok). Üçlü boyama.x1600. (Cubically shaped endothelial cells (arrow) in tunica intima).



Resim: 3
Endotel hücreleri arasında
makrofajlar (ok). Üçlü boyama
x1600. (Macrophages (ar-
row) between the endothe-
lial cells).



Resim: 4
Tunika intimada endotel al-
tında artan miktarlarda düz
kas hücreleri (oklar). Üçlü
boyama x2000. (Increasing
amounts of smooth muscle
cells (arrows) beneath the
endothelial layer in tunica
intima).

Tablo: I
Kontrol ve Deney Grubu Civcivlerde
Tunika İntima Kalınlıkları ve İstatistiksel Önemleri

	Kontrol $\bar{x} \mp S\bar{x}$	Deneme $\bar{x} \mp S\bar{x}$	% Farklılık
I. Vaka	0.057 \mp 0.0031	0.0848 \mp 0.0068	32.78*
II. Vaka	0.0566 \mp 0.0068	0.068 \mp 0.0011	16.64
III. Vaka	0.0475	0.0875	45.71

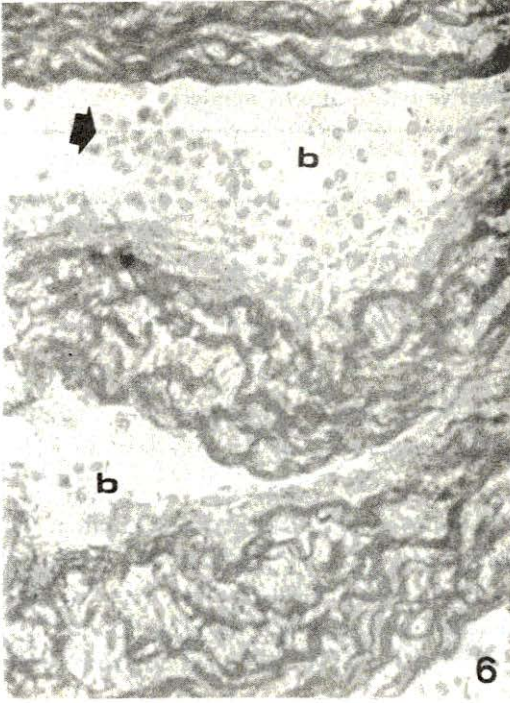
* $p \leq 0.01$

Üçlü boyama tekniği ile boyanan deney grubu aortalarının tunika adventisya katmanları yapısal özellikler açısından kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık göstermemiştir.

Giemsa-Orcein boyama metodu ile boyanan kontrol ve deney grubu aorta kesitleri incelendiğinde, tunika medianın esas yapısını oluşturan elastik membranlarda yer yer kopmalar olduğu, elastik ipliklerin kopma ve kırılma bölgelerinde yoğunlaşarak membranların tamirine çalıştıkları gözlenmiştir (Resim: 5). Elastik membranlar arasında yer yer fokal boşluklar ve içersinde tanımlanamayan materyaller belirlenmiştir (Resim: 6).



Resim: 5
Elastik membranlarda kopmalar ve bu bölgelerde yoğunlaşan elastik iplikler (oklar). Giemsa-Orcein.x400. (Focal breaks in the elastic lamellae and increasing amounts of elastic fibres (arrows) at these areas).



Resim: 6

Elastik membranlar arasında fokal boşluklar (b) ve içlerinde tanımlanamayan materyaller (ok). Giemsa-Orcein.x1600. (Focal cavities (b) contained unknown materials (arrow) between elastic lamellae).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Konu ile ilgili çalışmalar yapan bazı araştırmacılar^{4.5.21} bakırı noksan diyetle beslemenin civcivlerde, bazıları¹⁴ da domuzlarda arteriyosikleroza neden olduğunu bildirmişlerdir.

Civciv, tavuk, horoz ve ördeklerle yaptığı deneysel ateromatöz çalışmalarda Gould¹², insanlarda yapılan deneysel ateromatöz çalışmalardan elde edilen bulgularla benzer sonuçlar elde etmiştir. Simpson¹⁶, yağlı karaciğer sendromu geçiren henüz yumurtaya gelmemiş tavuklarla; Clarkson¹³, yüksek (plasma) kolesterol seviyesine sahip maymunlarla yaptıkları çalışmalarda, aortalarda endotel üzerinde yaygın ve şiddetli arteriyosklerotik plaklara rastlamışlardır. Bu çalışmamızda insanlardaki ile benzer bulgular elde edilmesine rağmen, deney grubunu oluşturan civcivlerin aortalarının hiçbirisinde arteriyosklerotik plaklara rastlanmamıştır.

Ham²², diyetle bağlı arteriyoskleroz olgularında monositlerin endotela bağlandıklarını, daha sonra intimaya göç edip orada makrofajlara dönüşerek sitoplazmalarında lipidleri biriktirdiklerini ayrıca, tunika mediyadaki düz kas hücrelerinin de tunika intimaya göç edip burada prolifer olarak sitoplazmalarında lipoprotein kökenli kolesterol esterlerini topladıklarını bildirmiştir. Junqueira²³, arteriyosklerotik lezyonların, tunika intimanın kalınlaşması, düz kas hücrelerinin

ve ekstrasellüler bağdoku elementlerinin proliferasyonu ve düz kas hücreleri ile makrofajlarda kolesterolün depolanması ile karakterize olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, endotel hücreleri arasında makrofajların bulunduğu, tunika intimanın kalınlaştığı ve tunika mediyadaki bir kısım düz kas hücrelerinin tunika intimaya göç ettiği saptanmıştır.

Simpson²⁴, O'dell², civcivlerle ve Savage¹⁵, bakırı noksan diyetle beslenmiş hindilerle yaptıkları çalışmalarda aorta duvarında düzensiz bir kalınlaşma, tunika mediyadaki elastik membranlarda kopma, parçalanma ve membranlar arasında fokal boşluklar ile bu boşluklar içersinde bilinmeyen maddelerin biriktiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda da tunika intimanın kalınlaştığı, tunika mediyayı oluşturan elastik membranların yer yer kopuntuya uğradığı ve içlerinde tanımlanamayan materyallerle dolu fokal boşlukların bulunduğu saptanmıştır.

Bazı araştırmacılar^{2,4,15}, bakırı noksan diyetle beslenen civcivlerin elastik arterlerinde anevrizma ve rupturlar gördüklerini ve bu nedenle oluşan ölümlere rastladıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda aortaların duvarında anevrizma ve rupturlar görülmemiş ve bu nedenlerden ileri gelen ölümlere de rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, yeterli düzeyde bakır içermeyen rasyonla beslenen civciv aorta duvarlarının tunika intima ve tunika mediya katmanlarında arteriyosklerozu oluşturan yapısal değişikliklerin geliştiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. ERTÜRK, K.: Çeşitli Irklara Mensup Ergin Koyunların Tüm Kan Plazmalarında Bakır Miktarı Üzerinde Araştırmalar, A.Ü. Vet. Fak. Yayın., 1-39 (1967).
2. O'DELL, B.L., HARDWICK, B.C., REYNOLDS, G., SAVAGE, J.E.: Connective Tissue Defect in the Chick Resulting from Copper Deficiency, Society for Experimental Biology and Medicine, Proceedings, 108, 402-405 (1961).
3. JONES, T.C., HUNT, R.D.: Veterinary Pathology, Philadelphia, Lea and Febiger, 1066-1068 (1983).
4. CHUN SU, K., HILL, C.H.: The Interrelationship of Dietary Copper and Amine Oxydase in the Formation of Aortic Elastin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 24, 3, 395-400 (1966).
5. STARCHER, B., HILL, C.H., MATRONE, G: Importance of Dietary Copper in Formation of Aortic Elastin, Journal of Nutrition, 82, 318-322 (1964).
6. CARLTON, W.W., HENDERSON, W.: Cardiovascular Lesions in Experimental Copper Deficiency in Chickens, J. Nutr., 81, 200-208 (1963).

7. CHURCH, D.C.: Digestive Physiology of Ruminants, Vol. 2, Nutrition, USA, Copyright (1971).
8. PAMUKÇU, M.: Veteriner Patoloji, A.Ü. Vet. Fak. Yay., 253, 484-486 (1970).
9. BOLDEN, S.L., KRISTA, L.M., McDANIEL, G.R., MILLER, L.E., MORA, E.C.: Effect of Exercise on Aortic Atherosclerosis and Other Cardiovascular Variables Among Hyper and Hypotensive Turkeys, Poultry Science, 62, 1287-1293 (1987).
10. BRAUWALD, E., PETERSDORF, R., ISSELBACHER, K.: Harrison's Principles of Internal Medicine, New York, Mc Graw Hill Book Company, 1014-1024 (1987).
11. WEINER, H.B., OCKENE, J.S., LEVINE, P.H.: Inhibition of Atherosclerosis by Cod Liver Oil in a Hyperlipidemic Swine Model, The New England Journal of Medicine, 315, 14, 841-845 (1986).
12. GOULD, R.G.: Lipid Metabolism and Atherosclerosis, American Journal of Medicine, 11, 209-227 (1951).
13. CLARKSON, T.B., PRICHARD, R.W., BULLOCK, B.C., St. CLAIR, R.W., LEHNER, N.D.M., JONES, D.C., WAGNER, W.D., RUDEL, L.L.: Pathogenesis of Atherosclerosis, Some Advances from Using Animal Models. Experimental and Molecular Pathology, 24, 264-286 (1976).
14. WEISSMAN, N., SHIELDS, G.S., CARNES, W.H.: Cardiovascular Studies on Copper Deficient Swine, The Journal of Biological Chemistry, 238, 9, 3115-3118 (1963).
15. SAVAGE, J.R., BIRD, D.W., REYNOLDS, G., O'DELL, B.L.: Comparison of Copper Deficiency and Latyrism in Turkey Poults, Journal of Nutrition, 88, 15-25 (1966).
16. SIMPSON, C.F., HARMS, R.H.: Aortic Atherosclerosis in Nonlaying Hens with Fatty Liver Syndrome, Avian Disease, 27, 3, 652-653 (1982).
17. N.R.C.: National Academy Sciences, United States, Washington, Canadian Tables of Feed Composition, D.C. 92 (1969).
18. A.O.A.C.: Official Methods of Analysis, Vail-Ballou, Press, Inc. Binghamton (1960).
19. CROSSMANN, G.: A Modification of Mallory's Connective Tissue Stain with a Discussion of the Principles Involved, Anat. Rec. 69, 33-38 (1937).
20. PINCUS, H.: A Modification of Unna Teenzer's Procedure, Arch. Dermat. and Syph. 49, 355 (1944).
21. STARCHER, B., MATRONE, G., HILL, C.H.: The Influence of Copper

- Deficiency on Aortic Elastin of Chicks, Federation of American Societies for Experimental Biology, Federation Proceedings 22, 261 (1963).
22. CORMACK, D.H.: Ham's Histology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, IX, 436-437 (1987).
 23. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., KELLEY, R.O.: Basic Histology, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut/San Mateo, California, VI, 222-223 (1989).
 24. SIMPSON, C.F., HARMS, R.H.: Pathology of the Aorta of Chicks Fed Copper Deficient Diet, Experimental and Molecular Pathology, 3, 390-400 (1964).