



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KRONİK BAKIR MARUZİYETİNİN KUPROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Damla KOLCUOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Sercan ERGÜN

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**KRONİK BAKIR MARUZİYETİNİN KUPROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Damla KOLCUOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.23.010 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Damla KOLCUOĞLU tarafından, **Doç. Dr. Sercan ERGÜN** danışmanlığında hazırlanan “**KRONİK BAKIR MARUZİYETİNİN KUPROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 1 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Doç. Dr. Sercan ERGÜN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ümmet ABUR Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr.Üyesi Gonca GÜLBAY Ordu Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☒

Hayır ☐

04 /06 / 2023
Damla KOLCUOĞLU

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: KRONİK BAKIR MARUZİYETİNİN KUPROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 04.06.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 6

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

04 / 06 / 2023
Doç. Dr. Sercan ERGÜN

ÖZET

KRONİK BAKIR MARUZİYETİNİN KUPROPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Damla KOLCUOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Haziran/2023
Danışman: Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Amaç: Bakır çok düşük dozlarda bile toksik etkiler sergileyebilen bir ağır metal olduğundan ötürü, maruz kalındığı takdirde olumsuz sonuçlar meydana gelebilir. Redoks aktif özellikleri sayesinde reaktif oksijen türleri oluşturma kapasitesi bakır için bilinen toksisite mekanizmasıdır. Kuproptoz hücre ölüm yolağında hücre içinde artan bakır konsantrasyonlarının hücreleri ölüme sevk ettiği düşünüldüğünde, bakır maruziyeti ile kuproptoz yolağı arasındaki ilişkinin mevcutiyetinden söz edilebilir. Bu kapsamda, bu çalışmada kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmanın amacı doğrultusunda bir bakır madeninde çalışmış/çalışan 26 birey ve herhangi bir ağır metal maruziyet geçmişi bulunmayan 26 birey çalışmaya dahil edildi. Bireylerin serumlarında kuproptoz ile ilişkisi kanıtlanmış FDX1 ve SLC31A1 genlerinin ifade düzeyleri qPCR ile araştırıldı. Gen ifade düzeyleri kontrol grubu ve maruziyet grubu arasında istatistiksel analizlerle karşılaştırıldı ve demografik özellikler açısından karşılaştırmalar yapıldı. İki gen arasındaki ilişki korelasyon analizleri ile değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan analizler sonucunda FDX1 ifade düzeylerinin kontrol grubunda anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p<0,05$). SLC31A1 ifade düzeyleri ise kontrol grubuna kıyasla maruziyet grubunda yüksek bulundu fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Yaş, sigara ve maruziyet süresi parametreleri gen ifade düzeylerini anlamlı ölçüde etkilemedi ($p>0,05$). Maruziyet grubu özelinde FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, iki gen arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı ve bu değer anlamlılık değerine oldukça yakındı ($p=0,055$).

Sonuç: Yapılan değerlendirmeler sonucunda kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine bir etkisinin olmadığı ve FDX1 ve SLC31A1 genlerinin kronik bakır maruziyetinin tespiti için güvenilir biyobelirteçler olmadıkları sonucuna ulaşıldı. Bu sonuçların bu alanda yapılacak çalışmalar için bir fikir niteliğinde olduğu değerlendirildi.

Anahtar Sözcükler: Kronik Bakır Maruziyeti, Kuproptoz, Toksisite, FDX1, SLC31A1

ABSTRACT

EFFECTS OF CHRONIC COPPER EXPOSURE ON THE CUPROPTOSIS PATHWAY

Damla KOLCUOĞLU
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Medical Biology

Master, June/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sercan ERGÜN

Aim: Copper is a heavy metal that can show toxic effect even at very few doses so adverse effects may occur if exposed to copper. Because of its redox active property, its capacity to form reactive oxygen species is known toxicity mechanism for copper. Considering that increased copper concentrations in the cell in the cuproptosis cell death pathway lead to cell death, it can be mentioned that there is an association relationship between copper exposure and the cuproptosis pathway. In this study, it was aimed to evaluate the effects of chronic copper exposure on the cuproptosis pathway.

Method: For the purpose of the study, 26 individuals who worked/were working in a copper mine and 26 individuals without any heavy metal exposure history were included in the study. Expression levels of FDX1 and SLC31A1 genes, which have been proven to be associated with cuproptosis, were evaluated by qPCR in the serum of individuals. Gene expression levels were compared between the control group and the exposure group by statistical analysis, and comparisons were made in terms of demographic characteristics. The association between two genes was evaluated by correlation analysis.

Results: As a result of the analysis, it was observed that FDX1 expression levels increased significantly in the control group ($p<0,05$). SLC31A1 expression levels were higher in the exposure group compared to the control group, but this value was not statistically significant ($p>0.05$). Age, smoking and exposure time parameters did not significantly affect gene expression levels ($p>0.05$). When the association between FDX1 and SLC31A1 expression levels in the exposure group was examined, a moderate positive correlation was found between the two genes and this value was very close to the significance value ($p=0.055$).

Conclusion: As a result of the evaluations, it was concluded that chronic copper exposure has no effect on the cuproptosis pathway and that FDX1 and SLC31A1 genes are not reliable biomarkers for the detection of chronic copper exposure. These results were considered to be an idea for future studies in this area.

Keywords: Chronic Copper Exposure, Cuproptosis, Toxicity, FDX1, SLC31A1

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde bana yol gösteren, gerek ders döneminde gerekse tez aşamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan ve zor zamanlarda sabır ve hoşgörüyle yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sercan ERGÜN’e teşekkür ederim.

Başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ olmak üzere yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini bizimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmama dahil edilen numuneleri toplama konusunda yardımcı olan Çayeli Devlet Hastanesi Başhekimi Sayın Dr. Yahya KESİCİ’ye ve Çayeli Devlet Hastanesinde görevli hemşire Sayın Gülşah KÜÇÜKİSLAMOĞLU’na yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Başta Dilbeste DEMİR, Sümeyye KAYAOĞLU ve Yeda KELEŞ olmak üzere bu süreçte yardımlarını ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini esirgemeyen, desteği ve varlığıyla beni daha ilerisi için cesaretlendiren ve tez numunelerini toplama konusunda bana yardımcı olan sevgili babam Yusuf KOLCUOĞLU’na teşekkür ederim.

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini esirgemeyen şefkati ve varlığıyla beni daha ilerisi için cesaretlendiren sevgili annem Reyhan KOLCUOĞLU’na teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca sabır ve hoşgörü ile bana destek olan ve her zaman yanımda olan sevgili kardeşlerim Ercan KOLCUOĞLU ve Ceylin KOLCUOĞLU’na teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman sevgisi ve desteği ile yanımda olan, her türlü zorlukla mücadele azmi ile bana ilham olan sevgili kuzenim Melek Nur ATEŞ’e teşekkür ederim.

Damla KOLCUOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bakır	4
2.1.1. İnsan Vücudunda Bakır.....	4
2.1.2. Bakırın Hücre İçi Rollerini.....	11
2.1.2.1. Enzim Kofaktörü Olarak Bakır.....	11
2.1.2.2. Hücre İçi Sinyal İletim Süreçlerinde Bakır.....	14
2.1.2.3. İyon Kanalları İçin Bakır.....	17
2.1.3. Hücre İçi Bakır Homeostazı.....	18
2.1.4. Hücre İçi Bakır Dishomeostazı ile İlişkili Hastalıklar.....	21
2.2. Kronik Bakır Maruziyeti.....	26
2.2.1. Kronik Bakır Maruziyeti ve Toksisite	28
2.3. Bakır ve Hücre Ölüm Yolları.....	30
2.3.1. Apoptoz.....	30
2.3.2. Ferroptoz.....	32
2.3.3. Kuproptoz.....	35
2.3.3.1. Kuproptoz ile İlişkili Genler	38
3. YÖNTEM	41
3.1. Çalışma Grubu Seçimi ve Serum Örneklerinin Eldesi	41
3.2. Serum Örneklerinden RNA İzolasyonu.....	42
3.3. RNA Örneklerinden cDNA Eldesi ve Kalite Ölçümü.....	43
3.4. Real-Time PCR Analizleri.....	44
3.5. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Gönüllü Populasyonu	48
4.2. cDNA Ölçüm Sonuçları.....	49
4.3. Gen İfade Düzeyi Sonuçları.....	50
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ.....	63
KAYNAKÇA.....	64
EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	: Adeninil Siklaz
AKT	: Protein Kinaz B
APP	: Amiloid Öncü Proteini
Apo E4	:Apolipoprotein E Geni Epsilon 4 Aleli
ATP7A	: ATPase Bakır Taşıyıcı Alfa
ATP7B	: ATPase Bakır Taşıyıcı Beta
ATG13	: Otofaji İle İlişkili Protein 13
ATG101	: Otofaji İle İlişkili Protein 101
ATOX1	: Antioksidan 1 Bakır Şaperon
cAMP	: Adenosin 3',5'-Siklik Monofosfat
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma-2
BK	: Ca^{+2} ile Aktive Olan K^{+} Kanalı
BRAF	: B-Raf Proto-Onkojen, Serin/Treonin Kinaz
CAO	: Bakır Amin Oksidaz Enzimi
CCS	: Süper Oksit Dismutaz için Bakır Şaperon
COMMD1	: COMM (bakır metabolizma geni MURR1) Alanı İçeren Protein 1
COX	: Sitokrom C Oksidaz
COX1	: Sitokrom C Oksidaz Alt Birim 1
COX2	: Sitokrom C Oksidaz Alt Birim 2
COX17	: Sitokrom C Oksidaz Bakır Şaperon 17
COX11	: Sitokrom C Oksidaz Bakır Şaperon 11
CTR1	: Yüksek Afiniteli Bakır Alım Proteini 1
DBH	: Dopamin- β -Hidroksilaz
DLAT	: Dihidrolipoamid S-Asetiltransferaz
DLD	: Dihidrolipoil Dehidrojenaz
DMT1	: Divalent Metal Taşıyıcı 1
DOMON	: Dopamin Beta-Monooksijenaz N-Terminal Alanı
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinazı (ERK)
FDX1	: Ferrodoksin 1
FIP200	: Fokal Adezyon Kinaz Ailesi Etkileşimli Protein 200 Kda FIP200
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GPCR	: G-Protein-Bağlı Reseptörler

GPX4	: Glutatyot Peroksidaz 4
GSH	: Glutasyon
HIF-1	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1
IL-2	: İnterlökin-2
IL-4	: İnterlökin-4
LIAS	: Lipoik Asit Sentetaz
LIPT1	: Lipoiltransferaz 1
LOX	: Lizil Oksidaz
MT	: Metallotionin
mTORC2	: Rapamisinin Memeli Hedefi Kopleks 2
MAPK	: Mitojen Tarafından Aktive Edilmiş Kinaz
MDA	: Malondialdehit
MEK	: MAP Kinaz/ERK Kinaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NDK-B	: Nükleosit Difosfat Kinaz-B
PDE3B	: cAMP Degredasyon Fosfodiesteraz 3B Proteini
PDH	: Piruvat Dehidrojenaz
PDHA1	: Piruvat Dehidrojenaz E1 Alt Birim Alfa 1
PDHB	: Piruvat Dehidrojenaz E1 Alt Birim Beta
PDK1	: 3-Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1
PI3K	: Fosfatidilinositid (PI) 3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-Trisfosfat
PKA	: cAMP Bağımlı Protein Kinaz A
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SCO1	: Sitokrom C Oksidas Sentez 1
SCO2	: Sitokrom C Oksidas Sentez 2
SLC31A1	: Çözünen Taşıyıcı Aile 31 Üye 1
SLC7A11	: Çözünen Taşıyıcı Aile 7 Üye 11
STEAP	: Prostatın Altı-Transmembran Epitelyal Antijeni
SOD1	: Süperoksit Dismutas
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü

TNF	: Tümör Nekroz Faktör
ULK1	: Unc-51 Benzeri Otofaji Aktive Edici Kinaz 1
ULK2	: Unc-51 Benzeri Otofaji Aktive Edici Kinaz 2
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
XIAP	: X'e Bağlı Apoptoz İnhibitörü
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakırın insan vücudundaki yolculuğu	4
Şekil 2.2. SLC31A1 proteini temsili görünümü	5
Şekil 2.3. Enterositlerde bakır hareketleri.....	8
Şekil 2.4. Hepatositlerde bakır hareketleri.....	11
Şekil 2.5. Bakırın enzim kofaktörü olarak rolleri.....	13
Şekil 2.6. Hücre içi sinyal iletim süreçlerinde bakır.....	16
Şekil 2.7. İnsan bakır proteomu.....	19
Şekil 2.8. Bakır ve ferroptoz ilişkisi.....	34
Şekil 2.9. Kuproptoz mekanizması.....	36
Şekil 2.10. Doğal koşullarda kuproptoz yolağı.....	37
Şekil 4.11. FDX1 ve SLC31A1 genlerinin ifade düzeylerinin maruziyet ve kontrol grubu arasında kıyaslanması.....	51
Şekil 4.12. Bakır madeninde aktif çalışan bireyler ve önceden çalışmış bireyler arasında FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.13. Bakır madeninde çalışmış/çalışan bireylerin çalışma süresi açısından FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.14. Sigara içme ve bakır maruziyetinin FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeyleri üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.15. Maruziyet grubunda FDX1 ve SLC31A1 gen ifade düzeylerinin korelasyonu.....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Revers transkripsiyon reaksiyonu koşulları	44
Tablo 3.2. İfade düzeyleri belirlenen genlerin primerleri.....	45
Tablo 3.3. qPCR reaksiyonu bileşenleri.....	46
Tablo 3.4. qPCR reaksiyon koşulları.....	46
Tablo 4.5. Demografik özellikler.....	48
Tablo 4.6. cDNA konsantrasyon ve kalite ölçüm sonuçları.....	49
Tablo 4.7. qPCR sonucu elde edilen Ct değerleri.....	50



1. GİRİŞ

Dünya genelinde endüstriyel faaliyetler arttıkça canlılar için toksik olan ağır metallerin çevreye salınımının artışı ve bununla paralel olarak ağır metallere maruz kalma vakalarının artışı kaçınılmazdır. Ağır metal maruziyeti ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getiren sonuçlar doğurur ve artan endüstriyel faaliyetler ile birlikte ağır metal maruziyetinin araştırıldığı çalışmalar önem kazanır. Ağır metaller temel olarak metalik özellik sergileyen, atom numarası 20'nin üzerinde olan, yüksek yoğunluğa sahip ve çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etkiler sergileyebilen elementler olarak ifade edilebilir (Sadak, 2023; Yadav, Gupta, & Sharma, 2019) Arsenik, kurşun, kadmiyum ve cıva gibi ağır metaller olumsuz sonuçlar ile ilişkilendirilmiş başlıca elementlerdir (Fu & Xi, 2020). Bu elementler çeşitli şekillerde vücudun normal fizyolojik süreçlerine müdahale edebilir (Fu & Xi, 2020). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda ağır metallerin oksidatif strese neden olma rolleri birincil toksisite mekanizması olarak öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra organizmaların metabolik süreçleri için gerekli olan, hali hazırda hücresel mekanizmalarda rolleri bulunan ağır metaller bulunmaktadır.

Bakır, vücutta en bol miktarda bulunan ve fizyolojik süreçlere dahil olan ilk üç element arasında yer alan bir ağır metaldir (Osredkar & Sustar, 2011). Büyüme, gelişme, hücresel solunum, nörotransmitter sentezi, hormon üretimi gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan bakır, organizmalarda yüksek oranda korunmuş hücre içi homeostaza sahiptir (La Fontaine & Mercer, 2007). Bakır metabolizması ile ilgili birçok protein bulunmaktadır. Bu proteinler bakırın hücre içi ortamdan taşınımı noktasında görevli transmembran proteinleri, hücre içi ortamda bakırı bağlayarak hedef lokasyonlara ileten şaperon proteinleri, hücre içerisinde bakırın depolanmasından sorumlu olan proteinleri ve bakıra bağımlı proteinleri kapsar (La Fontaine & Mercer, 2007).

Bakır, biyolojik sistemlerde indirgenmiş form Cu^{+1} ve kararlı oksitlenmiş form Cu^{+2} olmak üzere iki farklı oksidasyon durumunda bulunur (Banci, Bertini, McGreevy, & Rosato, 2010). Cu^{+2} ve Cu^{+1} arasındaki geçişler bakırın redoks aktif özelliklerine atfedilir (Tsang, Davis, & Brady, 2021) Bakırın yüksek redoks potansiyelleri, süper oksit dismutaz (SOD1) gibi bakıra bağımlı çeşitli enzimler tarafından belirli reaksiyonlar için kullanılır (Scheiber, Dringen, & Mercer, 2013). Buna göre genellikle bakırın birkaç protein için statik kofaktör olarak işlev gördüğü söylenebilir. Bunun

yanı sıra bakır, hücrel süreçler için gerekli olan sinyal molekülü olarak ve çeşitli enzimler için yapısal bileşen olarak roller sergiler (Scheiber et al., 2013; Tsang et al., 2021).

Organizmalar için gerekli bir eser element olmanın yanı sıra hücre içinde bulunan yüksek dozlarda bakır toksiktir. Bakır maruziyeti, hücre içinde artan bakır konsantrasyonları sonucu bakır toksisitesine sebep olabilen bir olgudur. Bakır, evsel ya da tıbbi araçlarda bulunabilir, endüstriyel faaliyetler sonucu doğaya salınarak besin zincirine ve içme sularına dahil olabilir (Tian et al., 2015). Bakır maruziyeti için en riskli durumlar ise bakırın yüksek dozlarına maruz kalan mesleki alanlarda çalışmayı kapsar (Dorsey & Ingerman, 2004). Bakır madeni ve bakır işleme tesisleri çalışanları bu anlamda riskli gruplara dahil edilebilir. Bakıra maruz kalma süresi, maruz kalma şekli gibi değişkenlerin bakır maruziyetinin sonuçlarını etkilemesinin yanı sıra kronik bakır maruziyetinin uzun vadede oldukça olumsuz sonuçlara sebep olduğu bilinen bir gerçektir (Dorsey & Ingerman, 2004).

Bakırın redoks aktif özellikleri biyomoleküller için oldukça zararlı olabilecek reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaya sebep olur (Tsang et al., 2021). ROS, DNA ve protein gibi biyomoleküller ile etkileşime girerek biyomoleküllerde hasar meydana getirir (Jakubczyk et al., 2020; Zandalinas & Mittler, 2018). ROS oluşturma yetenekleri bakır kaynaklı toksisitenin başlıca sebebi olarak bilinir (Gaetke, Chow-Johnson, & Chow, 2014). Bunun yanı sıra hücre içinde artan bakır konsantrasyonları sonucu meydana gelen hücre ölümü de bakır toksisitesi için yeni bir olgudur. ‘Cuproptosis’ (Kuproptoz) olarak isimlendirilen yeni hücre ölüm yolağı, apoptoz, ferroptoz, nekroz gibi hücre ölüm yollarından farklıdır (Tsvetkov et al., 2022). Bakır bağımlı hücre ölüm şekli olarak ifade edilen kuproptoz yolağında hücre içerisinde artan bakır konsantrasyonları trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) görevli dihidrolipoamid s-asetiltransferaz (DLAT) proteinin agregasyonuna sebep olarak proteotoksiste meydana getirir ve hücreler ölüme mahkûm edilir (Tsvetkov et al., 2022). Ferrodoksin 1 (FDX1) geni kuproptoz mekanizması için anahtar genidir (Tsvetkov et al., 2022). Ayrıca Lipoiltransferaz 1 (LIPT1), Lipoik asit sentetaz (LIAS), Dihidrolipoil dehidrojenaz (DLD), Dihidrolipoamid S-asetiltransferaz (DLAT), Piruvat dehidrojenaz E1 alt birim alfa 1 (PDHA1), Piruvat dehidrojenaz E1 alt birim beta (PDHB), Çözünen taşıyıcı aile 31 üye 1 (SLC31A1) ve ATPaz bakır taşıyan beta (ATB7B) genleri de kuproptoz ile ilişkili genlerdir (Tsvetkov et al., 2022).

Bakıra maruz kalma riski yüksek olan mesleki ortamlarda çalışan bireylerde kanser riskinin arttığına dair bulgular sunulmuştur (R. Chen, 1996; R. Chen, Wei, & Huang, 1993). Buna ek olarak bakır toksisitesi olarak değerlendirilen ROS oluşumu ve buna paralel olarak oksidatif hasarın meydana gelmesi ile kronik bakır maruziyeti arasındaki ilişkiye dair güçlü kanıtlar mevcuttur. Bakıra maruz kalan bireylerde DNA hasarının arttığına dair elde edilen sonuçlar bunlara örnektir (Da, 2019; De Olivera et al., 2012; Shahrokhi, Zavar Reza, Andishmand, Momtaz, & Zare Sakhvidi, 2021). Diğer bir taraftan kuproptoz hücre ölüm yolağı için bakır maruziyeti ile ilişkilendirilen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada en az 10 yıl süre ile bakır ağır metale maruz kalmış bireylerde ve demografik özellikler bakımından eşleştirilmiş herhangi bir ağır metal maruziyet geçmişi bulunmayan gönüllü bireylerde kuproptoz ile ilişkili genler FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin araştırılarak maruziyet grubu ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmalar sonucu kronik bakır maruziyetinin kuproptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

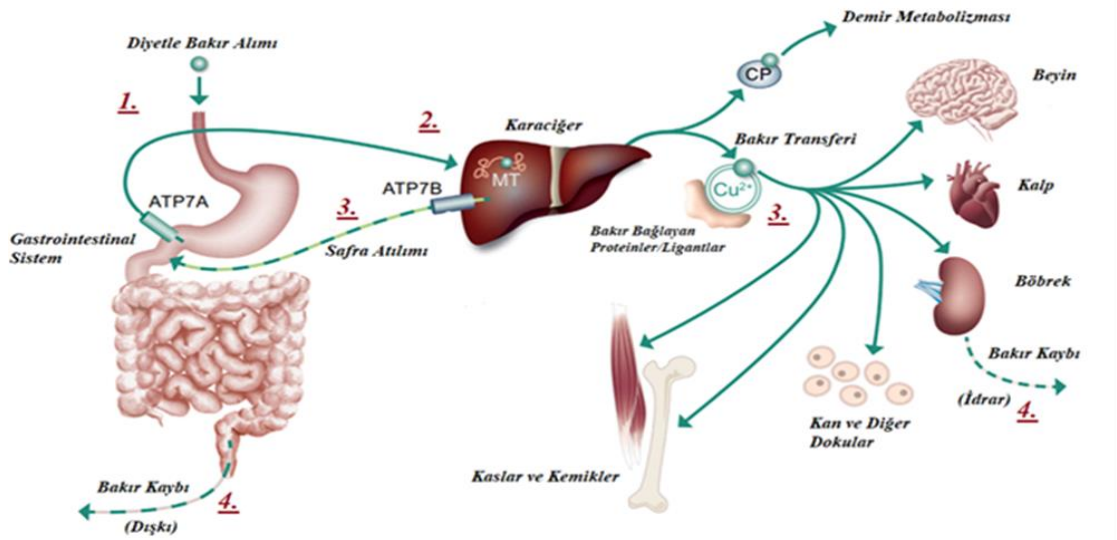
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakır

Bakır, atom numarası 29, atomik kütlesi 63.5 dalton olan, toprak, su, kaya ve hava gibi çeşitli yerlerde bulunan kızılsımsı renge sahip bir elementtir (Collins, 2020; Dorsey & Ingeman, 2004). Elektrik ve ısı iletkenliği, korozyona direnci, antimikrobiyal özellikleri ve canlı organizmalarda meydana gelen çeşitli proseslerdeki aktif rolleri nedeni ile bakır, endüstriyel alanlardan ilaç sektörüne kadar geniş bir kullanım yelpazesi ile ticari yönler barındırmaktadır (Dorsey & Ingeman, 2004; Henckens & Worrell, 2020).

2.1.1. İnsan Vücudunda Bakır

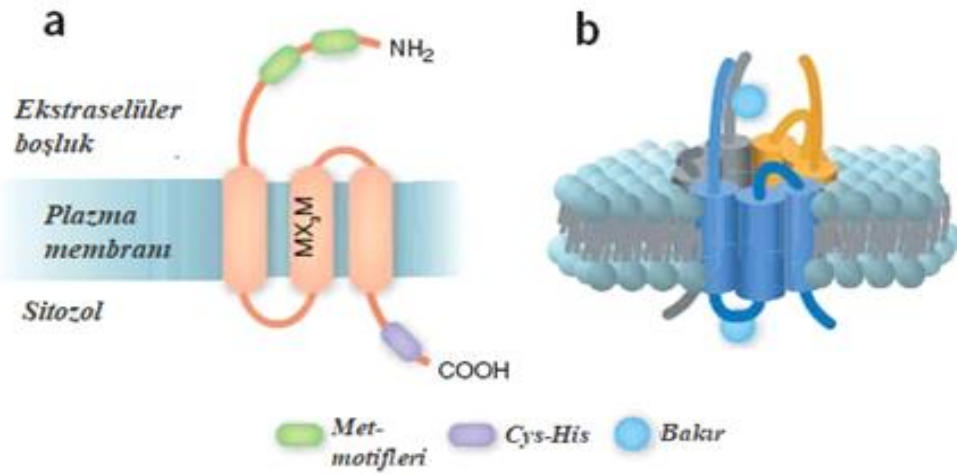
Normal fizyolojiye sahip sağlıklı bir bireyde besinlerde bulunan bakır gastrointestinal sistem aracılığı ile vücuda alınır (Abou Zeid & Kaler, 2019). Bakırın mide ve ince bağırsakta besinlerden emilimi ile insan vücudu içerisindeki macerası başlar (Şekil 2.1). Günlük ortalama alınan bakırın (1,5 mg) yaklaşık %50 'si mide ve ince bağırsaktan emilir (Iakovidis, Delimaris, & Piperakis, 2011). Gastrointestinal sistem aracılığı ile vücuda alınan bakır, ardından bakırı depolayan ana organ olan karaciğere transfer edilir ve buradan farklı dokulara ve organlara transferi sağlanır. Hücre içerisine giren bakır iyonları genellikle protein gibi refakatçilerine bağlı olarak bulunur ve aksi halde bulunan bakır serbest bakır olarak ifade edilir (Banci et al., 2010; McMillin, Travis, & Hunt, 2009).



Şekil 2.1. Bakırın insan vücudundaki yolculuğu (Collins, 2020)

Enterositlerde Bakır

Bakır, esas olarak enterositlerin apikal zarı boyunca CRT1 olarak da bilinen SLC31A1 transmembran proteini aracılığı ile hücre içerisine alınır (Ge et al., 2022). SLC31A1 proteini, memelilerde SLC31A1 geni tarafından kodlanır (Wee, Weinstein, Fraser, & Assinder, 2013). Genin kodladığı 4744 baz çiftlik ürünün (transkript) protein çevirisi (translasyon) sonucu 190 amino asite sahip bir monomer oluşur (Wee et al., 2013). SLC31A1 proteininin monomerleri üç transmembran alana sahiptir (Puig & Thiele, 2002). Proteinin hücre dışı boşlukta yer alan N-terminal kısmı metiyonin açısından zengin iken sitozolde yer alan C-terminal kısmı sistein/histidin kümesinden oluşur (Kim, Nevitt, & Thiele, 2008; Puig & Thiele, 2002). Proteinin zara tamamen gömülü olan ikinci transmembran alanı ise MXXXM motiflerinden oluşur (Kim et al., 2008). MXXXM motifinin bakır alımı için önemli olduğu bildirilmiştir (Puig & Thiele, 2002). SLC31A1 proteini monomerleri bir araya gelerek trimerik bir yapı oluşturur ve böylece bakır iyonları ve diğer metal iyonlarının geçişi için gözenekli bir yapı meydana gelir (Wee et al., 2013)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. SLC31A1 proteini temsili görünümü (Kim et al., 2008)

SLC31A1 proteini hücrelerde hem plazma membranında hem de hücre içi veziküllerde bulunur (Lutsenko, 2010). Bu proteinin enterositlerin bazolateral membranında lokalize olarak kandan bakır alımına aracılık ettiği de bildirilmiştir

(Zimnicka, Maryon, & Kaplan, 2007). Protein, hücresel fonksiyonlar sırasında hücre içi veziküller ve plazma zarı lokasyonları arasında konumunu değiştirebilir (Wee et al., 2013). Biyolojik sistemlerde bakır, indirgenmiş Cu^{+1} ve oksitlenmiş Cu^{+2} formlarında bulunabilir ve bu bakır için oldukça önemli bir özelliktir (Banci et al., 2010). Oksitlenmiş formdaki bakır iyonlarının SLC31A1 gibi yüksek afiniteli bir taşıyıcı aracılığı ile hücre içine alınabilmesi için indirgenmiş forma dönüştürülmesi oldukça önemli bir adımdır (Ohgami, Campagna, McDonald, & Fleming, 2006). Bundan ötürü SLC31A1 ile hücre içerisine alınmadan önce, prostatın altı-transmembran epitelyal antijeni (STEAP) redüktaz ailesi proteinleri Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirger (Tsang et al., 2021). STEAP proteinleri yalnızca bakır değil demiri de indirgeyebilen redüktazlardır ve bu proteinlerin hücrel bakır ve demir alımını arttırdığı bildirilmiştir (Ohgami et al., 2006).

Bakırın hücre içi ortama alınmasında SLC31A1 dışında farklı mekanizmaların da var olduğu gösterilmiştir (Espinoza et al., 2012; Lin, Zhang, Wang, Chen, & James Kang, 2015). Divalent metal taşıyıcı (DMT1), başta demir olmak üzere birkaç metal iyonunun hücre içi ortama transferi noktasında rol oynamaktadır (Espinoza et al., 2012). Hücrelerde SLC31A1 protein seviyelerindeki eksikliğin bakır alım mekanizmasının kayda değer oranda etkilenmediği ve bu koşullar altında DMT1 proteinin bakır alımına aracılık ettiği görülmektedir (Lin et al., 2015). Hücre dışı bakır konsantrasyonlarının artması ile birlikte SLC31A1 protein seviyeleri azalır ve aynı koşullar altında DMT1 protein seviyeleri artar ve bu durumda DMT1'in SLC31A1 eksikliğinde bakır alımını devam ettirdiği görülür (Lin et al., 2015). SLC31A1 proteini Cu^{+1} iyonlarının hücre içi ortama alımında rol oynarken, DMT1 proteini oksitlenmiş form olan Cu^{+2} 'nin hücre içi ortama alınmasından sorumludur (Yong Li et al., 2017). Memeli on iki parmak bağırsağında baskın bir demir ithalatçısı olarak bilinen DMT1'in, demir eksikliği koşullarında ifade düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Jiang, Garrick, Garrick, Zhao, & Collins, 2013). Bu durumda demir eksiliği sırasında artan DMT1 ifadesi ile hücre içi bakır ithalatının da arttığı ifade edilmektedir (Jiang et al., 2013).

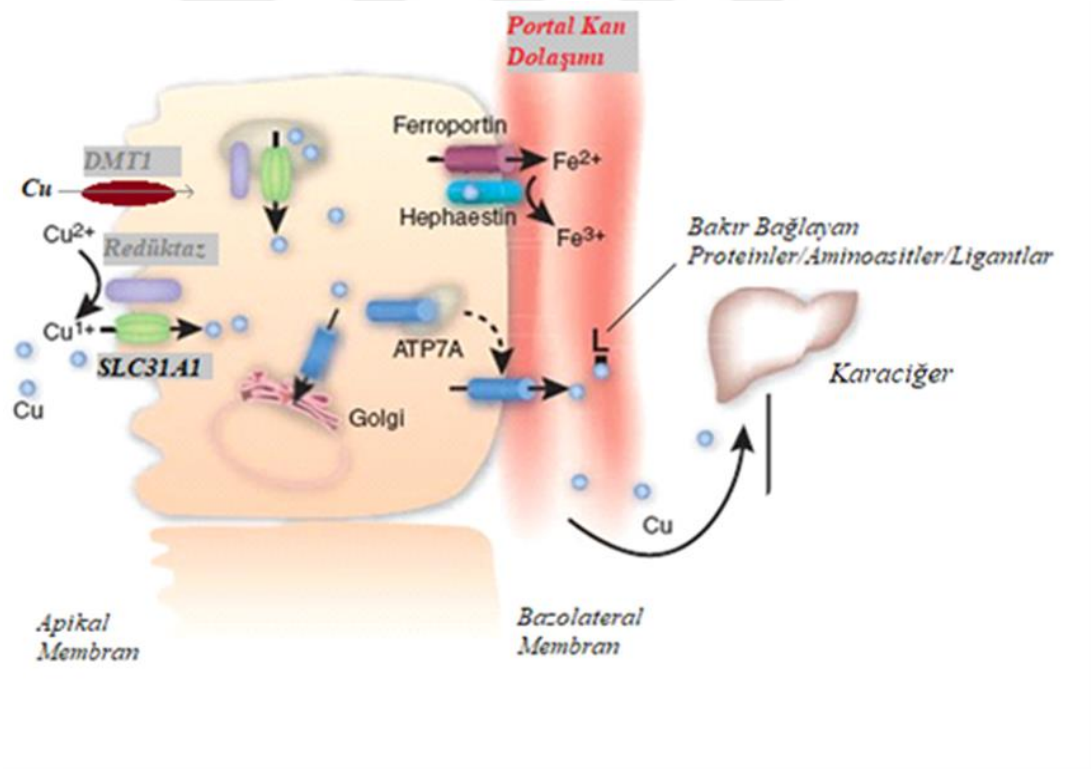
Enterositlerin apikal zarından hücre içerisine alınan bakır iyonları sitozolde çeşitli protein ve moleküllere bağlanır (Banci et al., 2010; Wittung-Stafshede, 2021) (Şekil 2.3). Bakır şaperonlar, bakır iyonlarını bağlayarak bakırın hedef lokasyonlara iletilmesinden sorumlu olan ana bakır bağlayıcı proteinlerdir (Banci et al., 2010).

Süper oksit dismutaz için bakır şaperon CCS ve antioksidan 1 bakır şaperon (ATOX1) proteinleri bu proteinlere örnektir (Herman et al., 2022). Şaperonlara bağlanan bakır iyonları bağlı olduğu protein veya moleküle göre enterositler boyunca üç farklı yolda hareket eder (Banci et al., 2010). Buna göre bakır iyonları önemli bir antioksidan enzim olan SOD1'e iletilebilir, mitokondride bulunan sitokrom C oksidaz (COX)'a teslim edilebilir veya trans-golgi ağını oluşturan salgı yolağına dahil edilebilir (Banci et al., 2010).

Süper oksit dismutaz için bakır şaperon CCS proteini, SOD1 antioksidan enzimine bakır iyonlarının teslimini sağlar (M. Fetherolf, Boyd, Winkler, & Winge, 2017). CCS bir bakır bağlayıcı CxxC motifine sahiptir (M. Fetherolf et al., 2017). CCS, CxxC motifi sayesinde bakır iyonlarının SOD1 enziminin katalitik alanına dahil olmasını sağlar ve SOD1'in stabilizasyonu için gereken molekül içi disülfid bağı oluşumunu düzenler (Tsang et al., 2021). SOD1, hücresel solunum gibi süreçler sonucunda üretilen serbest radikallerin, oksijen ve hidrojen peroksit dönüşümünü katalizleyerek antioksidan savunma sağlar (Eleutherio, Magalhães, de Araújo Brasil, Neto, & de Holanda Paranhos, 2021). SOD1 enzimleri genel olarak sitozolde bulunur fakat mitokondride zarlar arası boşlukta da bulunabilir (Lutsenko, 2010). SOD1'in sitozoldeki ve mitokondrideki dağılımı ve aktivitesi CCS'nin hücre içi lokalizasyonuna (Mitokondri ya da sitozolde bulunma oranı) göre belirlenir (Kawamata & Manfredi, 2008). CCS'nin mitokondriye ithalatı sitozolde artan oksijen oranları ile engellenir ve bu durumda CCS'nin sitozolde bulunması SOD1'in sitozolde aktifliğini artırır (Kawamata & Manfredi, 2008). Fizyolojik oksijen koşullarında ise CCS'nin mitokondriye ithalatı teşvik edilerek mitokondride SOD1 aktivitesi artar (Kawamata & Manfredi, 2008).

Hücreye giren bakırın izleyebileceği diğer bir yol COX'un aktivasyonunu sağlamaktır. Bakır iyonlarının mitokondriye tesliminde CuL anyonik ligandı rol oynar (Garza, Swaminathan, Maremanda, Zulkifli, & Gohil, 2022). Mitokondriyal zarlar arası boşluğa teslim edilen bakır iyonları ardından sitokrom C oksidaz bakır şaperon 17'nin (COX17) aktivitesi ile COX'a teslim edilir (Collins, 2020; Herman et al., 2022).

ATOX1 metal bağlayıcı şaperon yüksek oranda korunmuş bir metal bağlama motifi içeren (CxxC) 68 amino asitten oluşan sitozolik bir proteindir (Hatori & Lutsenko, 2016; Muller & Klomp, 2009). Bu protein insanlarda 5. Kromozomda bulunan ATOX1 geni tarafından kodlanır (Hatori & Lutsenko, 2013). ATOX1 proteini entositlerde bakır iyonlarını trans-golgi ağında ve hücre içi veziküllerde bulunan, bakır taşıyan ATPaz'ların bir üyesi olan ATPaz bakır taşıyıcı alfa (ATP7A)'ya iletir (Herman et al., 2022). Enterositlerde trans-golgi ağına lokalize olmuş ATP7A proteinlerinin, bakır seviyelerinin arttığı koşullarda bazolateral bölgeye transferi gerçekleşir (La Fontaine & Mercer, 2007). Buna göre ATOX1 proteinine bağlanan bakır iyonları ATP7A'ya teslim edildikten sonraki süreçte salgı yolağı boyunca ATP7A proteini aracılığı ile enterositlerin bazolateral membranından ihraç edilir (Collins, 2020). ATOX1'in salgı yolağındaki bakır bağımlı antioksidan enzimlere bakırı teslim etme yoluyla veya şaperon aktivitesinden bağımsız bir mekanizma ile oksidatif strese karşı savunmada rol oynadığı da bildirilmiştir (Hatori & Lutsenko, 2016).



Şekil 2.3. Enterositlerde bakır hareketleri (Kim et al., 2008)

Enterositlere transfer olan bakır iyonları ayrıca metallothionein (MT) ve glutatyon (GSH) aracılığı ile hücre içerisinde depolanabilir (Collins, 2020). Bakır iyonlarının ROS oluşturabilme özelliklerinden dolayı hücre içerisinde daima bir

molekül veya proteine bağlı olması gerektiği düşünüldüğünde bu mekanizma büyük önem taşımaktadır (Gaetke et al., 2014). MT'ler, sistein açısından zengin küçük proteinlerdir ve bitkilerden omurgalılara kadar çeşitli organizmalarda bulunurlar (Coyle, Philcox, Carey, & Rofe, 2002). Antioksidan savunma mekanizmasında görev alan GSH, bakırın hücre içi homeostazı için önemli bir moleküldür (Bhattacharjee, Chakraborty, & Shukla, 2017).

İnce bağırsak enterositleri tarafından emilerek vücuda alınan bakır buradan karaciğere transfer edilir (Collins, 2020). Enterositlerin apikal membranında meydana gelen bakır ihracatı için sorumlu protein ATP7A'dır (Abou Zeid & Kaler, 2019; Collins, 2020; Kim et al., 2008). Artan bakır birikimi ile birlikte trans-golgi ağından türeyen veziküller ile bakır iyonlarının bağlı olduğu ATP7A, bazolateral membrana yer değiştirir ve bu yol ile bakır iyonları portal kan dolaşımına dahil edilir (Collins, 2020). Portal kan dolaşımına dahil edilen bakır, burada albümin ve transkuprein gibi serum proteinlerine ve histidin, glutamin, treonin ve sistin gibi aminoasitlere bağlanır (Abou Zeid & Kaler, 2019; Ramos et al., 2016). Bu etkileşimler ile birlikte bakırın portal kan dolaşımı yoluyla karaciğere transferi kolaylaştırılır (Abou Zeid & Kaler, 2019).

Hepatositlerde Bakır

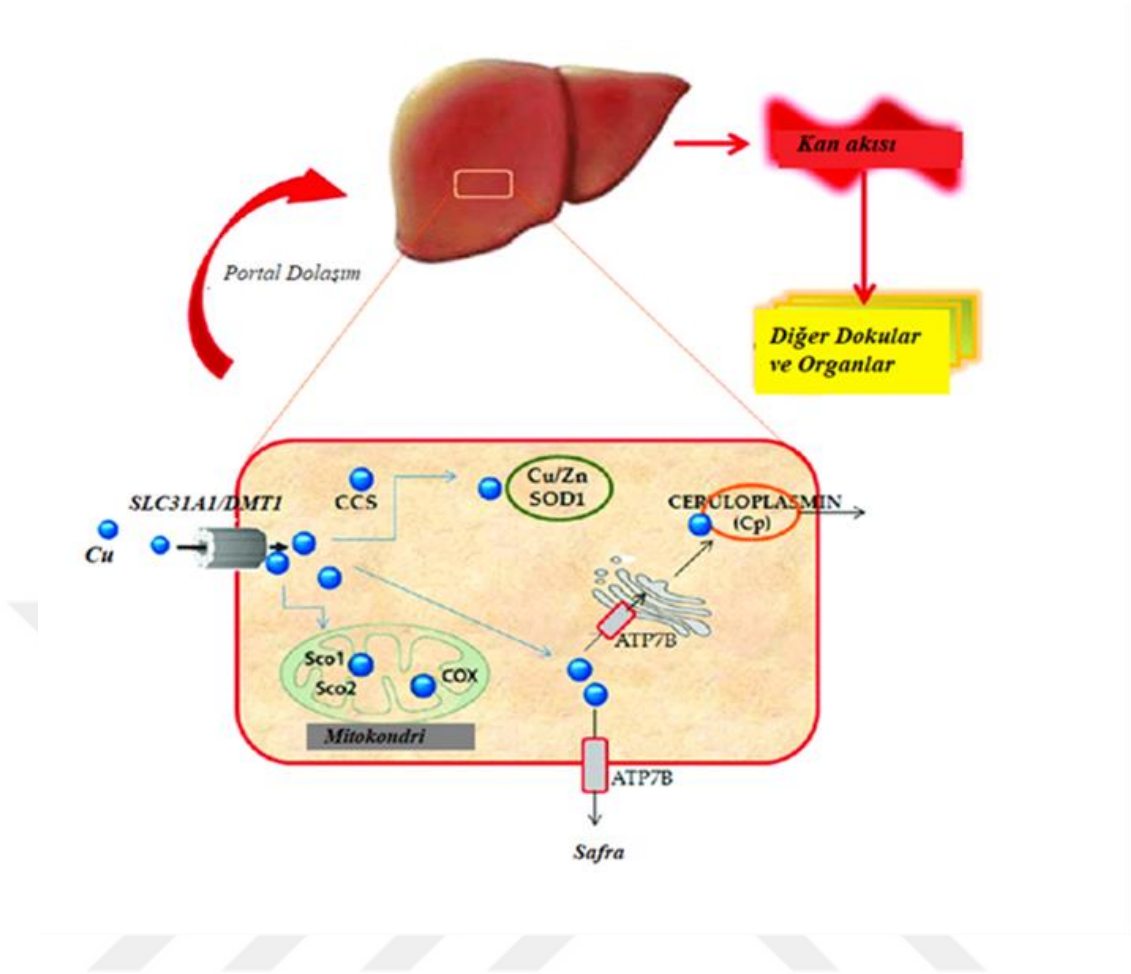
Karaciğer bakır homeostazı için merkezi bir organdır ve vücutta bakırın depolandığı ana lokasyondur (Collins, 2020). Enterositlerden portal kan dolaşımına dahil edilen bakır iyonları hepatositlerin membranında bulunan SLC31A1 tarafından hücre içerisine alınır (Abou Zeid & Kaler, 2019; Collins, 2020; Crisponi et al., 2010) (Şekil 2.4). Enterositlere bakır alım mekanizmasına benzer bir süreçle STEAP redüktazların Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgemesi ile birlikte SLC31A1 hepatositlere Cu^{+1} alımını sağlar (Collins, 2020; Doguer, Ha, & Collins, 2018). Hepatositlerde SLC31A1 aracılı bakır alımı enterositlerden farklı olarak bazolateral membranda gerçekleşir (Abou Zeid & Kaler, 2019). DMT1'in de hepatositlerde Cu^{+2} iyonlarının alımında rolü olduğu ifade edilmektedir (Abou Zeid & Kaler, 2019).

Hepatositlerde bakır iyonlarını bağlayan ana şaperonlar, ATOX1 ve CCS'dir (Doguer et al., 2018; Kim et al., 2008). Buna göre enterositlerde bakır iyonları mitokondriye taşınabilir, CCS aracılığı ile SOD1 proteinine teslim edilebilir ve ATOX1 aracılığı ile ATPaz'ların bir üyesi olan ATPaz bakır taşıyıcı beta (ATP7B) proteinine ulaştırılabilir (Doguer et al., 2018). Hepatositlerde fazla bakır MT'lere

bağlanma yolu ile veya lizozom içinde depolanabilir ki bu karaciğerin bu anlamda öncü bir organ olmasını işaret eder (J. Chen et al., 2020; Shanbhag et al., 2021).

Bakır homeostazının ana organı olarak görülen karaciğerde vücudun ihtiyaçlarına göre bakır iyonları hepatositlerde depolanabilir, kan dolaşımı yoluyla organlara iletilir ve safraya atılarak nihayetinde vücuttan uzaklaştırılabilir (Abou Zeid & Kaler, 2019). Bakırın vücudun diğer organlarına iletilmesi noktasında seruloplazmin proteini önemli bir rol üstlenir (Abou Zeid & Kaler, 2019). Seruloplazmin, esas olarak Fe^{+2} 'yi oksitleme yeteneğine sahip olan (ferroksidaz aktivitesi) bir metal bağlayan proteindir (Ramos et al., 2016). Buna ek olarak bakır içeren ana plazma proteini olarak da bilinir (Abou Zeid & Kaler, 2019; Ramos et al., 2016). Hepatositlerde seruloplazmin ATP7B tarafından trans-golgi ağında bakır ile yüklenir (Ramos et al., 2016). Enterositlerde trans-golgi ağında bulunan ATP7A'ya benzer şekilde ATP7B de hepatositlerde trans-golgi ağında lokalizedir (Abou Zeid & Kaler, 2019). Hepatositlere alınan bakır iyonları ATOX1 şaperon aracılığıyla ATP7B proteinine teslim edilir (Abou Zeid & Kaler, 2019; Collins, 2020; Ramos et al., 2016). Granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenen seruloplazmin, ATP7B ile trans-golgi ağında karşılaşır ve ATP7B seruloplazmine bakırı yükler (Linder, 2020). Bakır yüklü seruloplazmin hepatositlerden ekzositoz ile kana aktarılır ve sistemik kan dolaşımı aracılığı ile bakırın diğer organlara iletilmesini sağlar (Collins, 2020; Linder, 2020). Seruloplazminin periferik organların hücreleri ile direkt temas kurarak veya SLC31A1 gibi bakır taşıyıcılar aracılığı ile bu rolü meydana getirdiği ifade edilir (Ramos et al., 2016).

ATP7B proteininin bakırın karaciğerden ihracatında rol oynadığı anlaşılmaktadır (J. Chen et al., 2020; Collins, 2020). Karaciğerde artan bakır birikimi ile birlikte hepatosit trans-golgi ağında bulunan ATP7B proteini veziküler taşınma ile hepatosit apikal membranını doğru hareket eder (Roelofsen et al., 2000). Böylece veziküllerin içindeki bakır iyonları safra kanaliküllerine salınır (Linder, 2020). Bakır iyonları safradan geri emilebilir fakat besinlerden emilmeyen bakır ve endojen bakır dışkı yoluyla vücuttan atılır (Collins, 2020). Azalan bakır konsantrasyonları ile birlikte ATP7B proteinlerinin trans-golgi ağına geri döndüğü bildirilmiştir (Roelofsen et al., 2000).



Şekil 2.4. Hepatositlerde bakır hareketleri (Antonucci, Porcu, Iannucci, Balsano, & Barbaro, 2017)

2.1.2. Bakırın Hücre İçi Roller

2.1.2.1. Enzim Kofaktörü Olarak Bakır

Bakırın enzim kofaktörü olarak üstlendiği rolleri iki oksidasyon durumu arasındaki geçişlerine atfedilir (J. Chen et al., 2020). Bakırın kofaktör olarak bağlandığı enzimlerin başında elektron transferini azami seviyeye çıkarmak için spesifik bölmelere sahip olan oksijenazlar, hidroksilazlar ve transferazlar yer alır (Tsang et al., 2021). Bu enzimlerin en bilinen örnekleri COX ve SOD1'dir. Bunların yanı sıra bakırın kofaktör olarak etkileşime girdiği birkaç enzim bulunmaktadır. Bakır kofaktörü olarak bağlandığı enzimlerden ötürü farklı süreçlere katılır (Şekil 2.5).

Enerji Üretimi

Ökaryotlarda adenosin trifosfat (ATP) üretimi oksidatif fosforilasyon ile mitokondride gerçekleşir (Srinivasan & Avadhani, 2012). Oksidatif fosforilasyon sistemi beş farklı enzimden oluşur ve bu enzimlerin her biri bir oksidatif fosforilasyon kompleksini temsil eder (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018). COX, bu sistemin

dördüncü kompleksidir (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018). Elektron transfer zincirinin terminal enzimi olan COX, H₂O oluşturmak üzere sitokrom C'den oksijene elektron transferi işleminin son adımını katalizler (Srinivasan & Avadhani, 2012). Bu reaksiyonlar tarafından salınan enerji, COX' un protonları mitokondriyal matristen zarlar arası boşluğa pompalamasına izin verir (Brischigliaro & Zeviani, 2021)

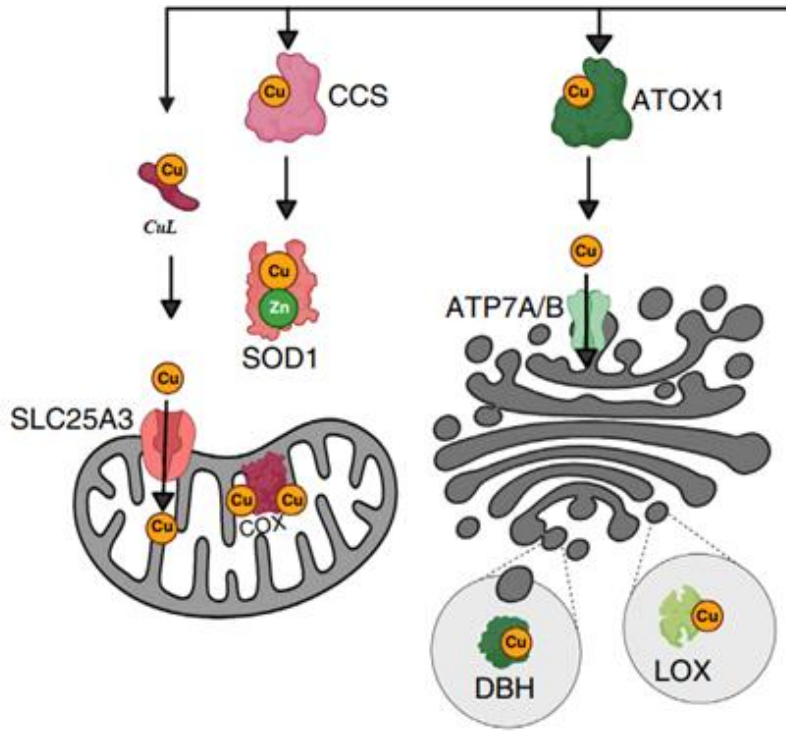
COX, oksidatif fosforilasyon mekanizmasındaki görevini tamamlamak için CuA ve CuB olmak üzere iki adet bakır metal bağlama merkezi kullanır (Brischigliaro & Zeviani, 2021; Tsang et al., 2021). COX' da bulunan bu bakır merkezlerinin oluşumunda birçok protein kompleksi aktif rol oynar (Horng, Cobine, Maxfield, Carr, & Winge, 2004). COX17 şaperon proteini mitokondriyal zarlar arası boşlukta bulunan bakır iyonlarını sitokrom C oksidaz sentez proteini 1 (SCO1), sitokrom C oksidaz sentez proteini 2 (SCO2) ve sitokrom C oksidaz bakır şaperon 11 (COX11) şaperonlara aktarır (Horng et al., 2004). COX17'den bakırı teslim alan SCO2, SCO1 tarafından kolaylaştırılan bir reaksiyonla bakır iyonlarını CuA bölgesini oluşturan sitokrom C oksidaz alt birim 2'ye (COX2) yerleştirir (Horng et al., 2004; Leary et al., 2004). COX11, COX17'den teslim aldığı bakır iyonlarını sitokrom C oksidaz alt birim 1'e (COX1) yerleştirerek CuB merkezinin oluşumunda rol oynar (Carr, George, & Winge, 2002). ATP sentezi için oldukça önemli bir enzim olan COX'un katalitik alt birimlerinin oluşumu için gerekli olan bakır bu noktada enerji üretim mekanizmasında aktif roller üstlenir.

Antioksidan Savunma

Mitokondride enerji üretimi sırasında oluşan ROS oksidatif stresin birincil kaynağıdır (Tsang et al., 2021). Bakır, ROS' a karşı savunmada rol oynayan SOD1'in kofaktörüdür (Eleutherio et al., 2021; Tsang et al., 2021). İnsan SOD1 proteini homodimerik bir yapıya sahiptir ve ökaryotik organizmalar arasında oldukça korunmuş bir protein olduğu ifade edilir (Eleutherio et al., 2021). Hücrede her yerde ifade edilebilen SOD1 proteini hücredeki proteinlerin %1-2'sini oluşturur (Hennig et al., 2015). Hücrelerde SOD1 genellikle antioksidan aktivitesini gerçekleştirmek için gerekli olan protein çevirisi sonrası (post-translasyonel) modifikasyonlardan yoksun şekli ile bulunur (Boyd, Ullrich, Skopp, & Winkler, 2020). SOD1'in antioksidan aktiviteleri sergilemesi için üç adet protein çevirisi sonrası (post-translasyonel) modifikasyon gereklidir (Boyd et al., 2020). Bunlar SOD1 aktif bölgesine bağlı bölgeye çinko bağlanması, SOD1 aktif bölgesine katalitik bakırın doğrudan

bağlanması ve disülfid bağı oksidasyonunu içerir (Boyd et al., 2020). SOD1'in çinko bağlanması translasyonun ardından meydana gelirken bakır, CCS aracılığı ile hücre içerisinde taşınarak SOD1'e eklenir (Tsang et al., 2021).

CCS üç protein alanından oluşur ve ikinci alan SOD1 ile CCS' nin kenetlenmesine yardımcı olur (Leitch, Yick, & Culotta, 2009). CCS ve SOD1 kenetlenmesi sonucu oluşan yapı SOD1'e bakır eklenmesi ve disülfid oksidasyonu modifikasyonlarını meydana getirir (Leitch et al., 2009). ROS uzaklaştırılmasında görevli SOD1'in aktivasyonunda rol oynayarak bakır, hücrede antioksidan savunma mekanizmalarında dolaylı roller üstlenmektedir.



Şekil 2.5. Bakırın enzim kofaktörü olarak rolleri (Tsang et al., 2021)

Biyomolekül Sentezi ve Diğer Roller

Bakırın kofaktör olarak dahil olduğu proteinlerden biri de dopamin- β -hidroksilaz'dır (DBH) (Hordyjewska, Popiolek, & Kocot, 2014). DBH, dopaminin norepinefrine dönüşümünü katalizleyen oksidoredüktaz aktivitesine sahip bir enzimdir (Gonzalez-Lopez & Vrana, 2020; Tsang et al., 2021). Norepinefrin, beyinde ve adrenal medullada, adrenal medulladan strese yanıt olarak salınan bir hormon olan epinefrin

(adrenalin) sentezinin öncüsüdür ve merkezi ve periferik sistemlerde nörotransmitter görevi görür (Feher, 2012; Gonzalez-Lopez & Vrana, 2020).

İnsan DBH enzimi bir dopamin beta-monooksijenaz N-terminal (DOMON) alanı, Cu_{His} ve Cu_{Met} şeklinde iki bakır bağlama alanından oluşan bir katalitik çekirdek ve tetramerizasyon alanı olmak üzere dört alana sahiptir (Gonzalez-Lopez & Vrana, 2020). Cu_{His} iki veya üç histidin aracılığı ile Cu_{Met} ise bir metiyonin aracılığı ile bakır iyonunu katalitik bölgeye şelatlayabilir (Gonzalez-Lopez & Vrana, 2020). Hücre içi bakır konsantrasyonları ile DBH aktivitesi arasındaki ilişkiler enzimin aktivitesi için bakırın önemini vurgular (Schmidt et al., 2018). Buna göre bakırın norepinefrin gibi biyomoleküllerin sentezi süreçlerinde rollere sahip olduğu ifade edilir.

Bakır amin oksidaz enzimi (CAO) bakıra bağımlı bir diğer enzimdir (Finney, Moon, Ronnebaum, Lantz, & Mure, 2014). Enzim, histamin gibi amin türlerinin aldehitlere ve amonyağa oksidatif deaminasyonunu katalizlemek için bakır iyonu ve kinon molekülüne ihtiyaç duyar (Finney et al., 2014).

Bakır bağımlı amin oksidazlara benzer şekilde lizil oksidazlar da (LOX) bakıra bağımlı amin oksidazlar olarak bilinir (Wang, Hsia, & Shieh, 2016). Enzim, kollojen ve elastinin çapraz bağlanması için lizin kalıntılarının oksidatif deaminasyonunu katalizler (Tsang et al., 2021). Hücre dışı matriksin yapısal bileşenlerinin düzenlenmesine aracılık ederek bakır, hücre dışı matriks oluşumuna katkıda bulunur.

Tirozinaz, insanlarda saç, cilt ve göz rengi pigmentasyonundan sorumlu melanin pigmentinin sentezi için gerekli olan enzimlerden biridir (Lai, Wichers, Soler-Lopez, & Dijkstra, 2018). Enzim, melanin sentezi için gerekli olan fenollerin oksidasyon reaksiyonlarını katalizler (Tsang et al., 2021). Bakır, tirozinaz enziminin aktivitesi için kofaktör olarak rol oynayarak bu süreçlere katkıda bulunur (Akyılmaz, Yorganci, & Asav, 2010).

2.1.2.2. Hücre İçi Sinyal İletim Süreçlerinde Bakır

MAPK Yolağı

Bakırın diğer bir rolü ise sinyal molekülleri olarak aktivite sergilemesine dayanır (Şekil 2.6). Bakır iyonları hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma gibi birçok hücresel süreçte rol oynayan ve evrimsel süreçte korunmuş mitojen tarafından aktive edilmiş kinaz (MAPK) sinyal yolağında aktivite sergiler (Turski et al., 2012). Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazı (ERK) aktive eden kinazlar olan MEK (MAP

Kinaz/ERK Kinaz) kinazların iki izoformundan (MEK1, MEK2) biri olan MEK1 doğrudan bakır iyonlarını bağlar ve bakır, MEK1 aktivitesini etkiler (Turski et al., 2012). Araştırmacılar bakır şelatörleri kullanarak ve bakır taşıyıcı SLC31A1'de mutasyonlar ile MEK1 kinazın ERK kinazı fosforilleme aktivitesinin azaldığını bildirmiştir (Turski et al., 2012). Bu sonuçlar bakırın MAPK sinyal yolu aktivasyonundaki rollerini işaret eder (Turski et al., 2012). MEK1 kinazda bakır bağlayan histidin ve metiyonin kalıntılarının mutaganezinin MEK1/2 kinaz inaktivesi ile sonuçlanması bakırın bu noktadaki rolünü doğrular (Brady et al., 2014). Bakır iyonlarının MEK1 kinaza teslim sürecinde CCS bakır şaperon görev alır (Grasso et al., 2021).

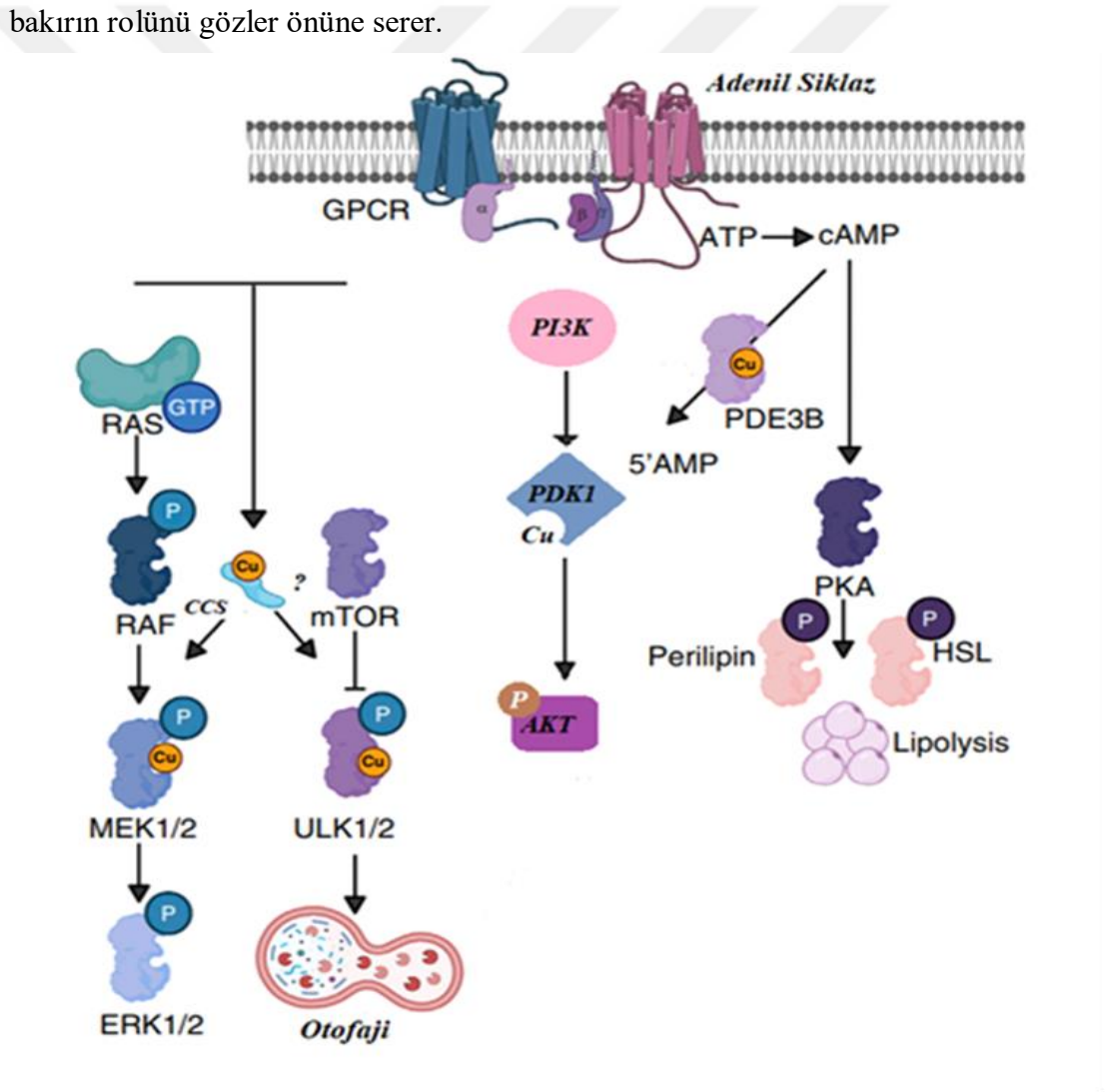
ULK1/2 Otofaji Yolağı

Organizmalar için kalite kontrol mekanizması olarak ifade edilen otofaji mekanizmasında sitoplazmik içerikleri içerisine alan çift zarlı otofagozomların oluşumu kilit adımdır (Zachari & Ganley, 2017). Otofagozomların oluşumuna fokal adezyon kinaz ailesi etkileşimli protein 200 kDa (FIP200), otofaji ile ilişkili protein 13 (ATG13) ve otofaji ile ilişkili protein 101 (ATG101) protein ortakları ile kompleks oluşturarak Unc-51 Benzeri Otofaji Aktive Edici Kinaz 1/2 (ULK1/2) serin/treonin protein kinazlar aracılık eder (Zachari & Ganley, 2017). ULK1/2 kinazlar MEK1 kinazlara benzer alanlarda (metiyonin ve histidin) bakır iyonlarını bağlar ve bakır bu proteinlerin kinaz aktivitesi için gereklidir (Tsang et al., 2020). Çeşitli yollarla hücre içi bakır seviyelerinin arttırılmasının ya da azaltılmasının ULK1/2 kinaz aktivelerini düzenlendiği görülmüştür (Tsang et al., 2020). ULK1'de bakır bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar ile bakır-ULK1 etkileşiminin bozulması sonucu proteinin aşağı akış substratı ATG13'ün fosforilasyonunda azalmalar ve sonuçta otofagozom kompleksi oluşumunda azalmalar bildirilmiştir (Tsang et al., 2020). Bu ifadeler bakır iyonlarının protein kinaz düzenleyicisi olarak ve otofaji için sinyal molekülü olarak rollerini ifade eder.

PI3K/AKT Yolağı

PI3K/AKT sinyal yolağı çeşitli hücresel süreçler için önemli roller üstlenir ve kanser ile örtüşen metastaz, anjiyogenez, hücre sağ kalımı gibi süreçleri kontrol eder (Y. He et al., 2021). Fosfatidilinositid (PI) 3-kinaz (PI3K), reseptör tirozin kinaz ile etkileşerek aktive olur ve fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosforile ederek fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfatı (PIP3) oluşturur (Cooper, 2016). PIP3, protein kinaz

B' nin (AKT) plazma zarına alımını sağlar (Cooper, 2016). Burada AKT, 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) ve rapamisinin memeli hedefi kompleks 2 (mTORC2) kinaz tarafından fosforillenerek aktive olur (Cooper, 2016). AKT aktive olduğunda transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar gibi çok sayıda proteini fosforiller (Cooper, 2016). Bu yolakta PDK1 bir bakır bağlayan kinazdır (Guo et al., 2021). PDK1'in bakır iyonlarını bağlaması proteinin AKT'yi fosforilleme aktivitesi için gereklidir (Guo et al., 2021). Bakır iyonları PDK1 kinaza His117 ve His203 kalıntılarından bağlanır (Guo et al., 2021). Bu amino asitlerde meydana getirilen mutasyonlar PDK1 bakır bağlanmasını bozar (Guo et al., 2021). PDK1 bakır etkileşimindeki azalmalar ise PDK1 aktivitesini bozar ve PDK1'in AKT1 fosforilasyonunu azaltır (Guo et al., 2021). Bu ifadeler PI3K/AKT sinyal yolağında bakırın rolünü gözler önüne serer.



Şekil 2.6. Hücre içi sinyal iletim süreçlerinde bakır (Tsang et al., 2021).

cAMP Yolağı

Adenosin 3',5'-siklik monofosfat (cAMP), transkripsiyon, hücre büyümesi ve farklılaşma gibi birçok hücrel süreçleri düzenler ve çeşitli sinyal yollarında sekonder haberci olarak rol oynar (Yan, Gao, Cui, Zhang, & Zhou, 2016). cAMP sinyalleri bakır iyonları tarafından düzenlenir (Krishnamoorthy et al., 2016). Bakır aracılı sekonder mesajcı cAMP düzenlenmesi, cAMP yolağı aracılığı ile trigliseritlerin yağ asitleri ve gliserole parçalandığı lipoliz sürecini düzenler (Krishnamoorthy et al., 2016). Bakırın cAMP seviyesinde lipolizi düzenleme mekanizmasında cAMP degradasyon fosfodiesteraz 3B proteini (PDE3B) anahtar moleküldür (Krishnamoorthy et al., 2016). PDE3B sistein kalıntılarından bakır iyonları bağlar ve bu PDE3B aktivitesinin inhibisyonuna sebep olur (Krishnamoorthy et al., 2016). cAMP degradasyon fosfodiesterazı PDE3B aktivitesinin inhibisyonu ile cAMP yolağı aracılı lipoliz artar (Krishnamoorthy et al., 2016). Hormon gibi hücre dışı uyanların G-protein-bağlı reseptörlere (GPCR'ler) bağlanması ile adeninil siklaz (AC) aktive olur ve bu cAMP bağımlı protein kinaz A'nın (PKA) aktivitesinin tetiklenmesi ile sonuçlanan cAMP artışına neden olur (Vitaliti, De Luca, & Rossi, 2022). PKA, hormona duyarlı lipaz ve peripilin gibi aşağı akış hedeflerinin fosforilasyonu aracılığı ile lipolizi düzenler (Krishnamoorthy et al., 2016). Sonuç olarak PDE3B'nin bakır bağımlı inhibisyonu PKA aktivitesini dolaylı olarak düzenleyerek lipolizin düzenlenmesini sağlar (Krishnamoorthy et al., 2016). Bu ifadelerin bir kanıtı olarak çeşitli ajanlarla bakır seviyelerinin azaltılması sonucu cAMP seviyelerinin azalışı, lipolizin azalışı ve bakır seviyelerinin arttırılması ile cAMP seviyelerinin artışı, lipolizin artışı bildirilmiştir (Krishnamoorthy et al., 2016).

2.1.2.3. İyon Kanalları İçin Bakır

KCa3.1 İyon Kanalı

KCa3.1, T hücreleri, B hücreleri ve mast hücrelerinin aktivasyonunda rol oynayan ve kalsiyum kalmodilin tarafından aktive edilen bir potasyum kanalıdır (Feske, Wulff, & Skolnik, 2015; Srivastava et al., 2016). KCa3.1 H358 kalıntısının nükleosit difosfat kinaz-B (NDK-B) tarafından fosforilasyonu ile aktive edilebilir (Srivastava et al., 2016) Diğer bir taraftan KCa3.1, H358 kalıntısı bakır iyonlarını bağlar ve bu histidin fosforilasyonunu engelleyerek KCa3.1 potasyum kanalının bakır aracılı inhibisyonuna sebep olur (Srivastava et al., 2016).

BK İyon Kanalı

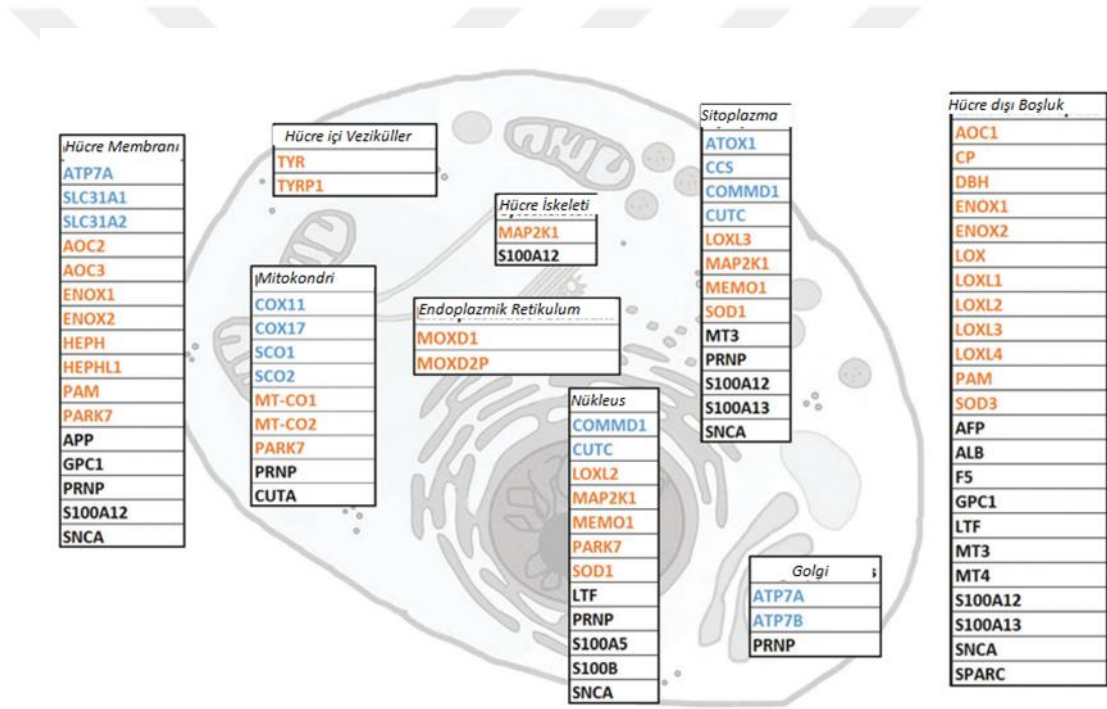
Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} kanalı (BK) yüksek iletkenliğe sahip bir iyon kanalıdır (Shah, Guan, & Yan, 2022). BK kanalları membran depolarizasyonu ile aktive edilir (Shah et al., 2022). BK kanalları hücre içine K^{+} iletimini sağlar ve bununla birlikte voltaja bağımlı K^{+2} kanallarının kapanmasına ve membran repolarizasyonuna yol açarak K^{+2} ve zar potansiyelinin negatif geri beslemesini düzenler (Feske et al., 2015; Shah et al., 2022). Bu iyon kanalları doğum sonrası merkezi sinir sisteminde yaygın olarak konumlandırılır ve nöronlarda K^{+} akışını düzenler (Contet, Goulding, Kuljis, & Barth, 2016). Birçok fizyolojik süreçte rol oynayan BK kanallarının herhangi bir düzensizliği epilepsi gibi merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları ile ilişkilendirilmiştir (Contet et al., 2016; Shah et al., 2022). BK kanalları hücre dışı Cu^{+2} konsantrasyonlarına son derece duyarlıdır (Ma, Wong, & Horrigan, 2008). Cu^{+2} iyonları BK kanallarının transmembran bölümleri ile etkileşime girer (Ma et al., 2008). Sonuç olarak hücre dışı Cu^{+2} iyonları BK kanallarının K^{+} iletimini azaltarak BK kanallarının güçlü bir inhibitörü olarak aktivite sergiler (Ma et al., 2008).

2.1.3. Hücre İçi Bakır Homeostazı

Bakır hücresel süreçler için gerekli bir eser elementtir fakat hücre içi artan veya azalan bakır konsantrasyonları istenmeyen durumları beraberinde getirebilir. Bakır homeostaz mekanizması bakır ithalatı, ihracatı, depolanması ve hücre içi lokasyonlara iletimi gibi süreçlerin dengeli bir şekilde yürütülmesini kapsar (La Fontaine & Mercer, 2007). İnsanlarda bakır elementi ile ilişkili birçok protein bulunmaktadır (Şekil 2.7). Bu proteinler bakırın hücre ithalatı ve ihracatından sorumlu proteinler, bakır şaperonlar, bakıra bağımlı enzimler gibi proteinleri kapsar (L. Chen, Min, & Wang, 2022). Bakır konsantrasyonundaki sapmalardan ötürü meydana gelen olumsuzlukları önlemek adına hücre içi bakır homeostazı bu protein sistemleri tarafınca oluşturulur (L. Chen et al., 2022).

Hücresel bakır homeostazının başlıca koruyucularından birinin SLC31A1 bakır ithalatçı proteini olduğu ifade edilir (Curnock & Cullen, 2020). Hücre dışında artan bakır konsantrasyonuna yanıt olarak SLC31A1'in endositozla hücre içerisine aktarıldığı ve tersi durumda ise SLC31A1'in hücre yüzeyine geri dönerek bakır homeostazını koruduğu bildirilmiştir (Curnock & Cullen, 2020).

Bakır ihracatında görevli olan bakır taşıyıcı ATPaz'lar (ATP7A, ATP7B) bakır homeostazı için büyük öneme sahip diğer bir protein sınıfıdır (La Fontaine & Mercer, 2007). Bu proteinler hücre içi bakır konsantrasyonlarındaki değişiklikleri algılayarak hücre içi bakır homeostazı sağlamak adına aktive olur (La Fontaine & Mercer, 2007). ATPaz'ların genelde hücre içi artan bakır konsantrasyonlarına yanıt olarak veziküler taşınım aracılığı ile trans golgi ağından bakır ihracatının gerçekleşeceği hedef membrana (apikal ya da bazolateral) hareket ederek artan bakır konsantrasyonlarını elimine ettiği ve böylece bakır homeostazını sağladığı bildirilmiştir (La Fontaine & Mercer, 2007). Bu proteinlerdeki herhangi bir dengesizlik Wilson ve Menkes Hastalıkları olarak bilinen genetik hastalıklara sebep olur (La Fontaine & Mercer, 2007).



Şekil 2.7. İnsan bakır proteomu (Blockhuys et al., 2017)

Bakır homeostazı için önemli moleküllerden biri de GSH' dir (Bhattacharjee et al., 2017). Bakırın hücreye ilk girişinin ardından GSH' ye bağlandığı ve ardından şaperonlara ya da MT'ye aktarıldığı ifade edilmektedir (Bhattacharjee et al., 2017). GSH seviyesi yalnızca bakır ithalatını değil aynı zamanda bakır ihracatını da düzenler (Bhattacharjee et al., 2017). Hücrel GSH tükenmesinin ATP7A'nın veziküler taşınımını etkilediği ve bunun hücrelerde artan bakır birikimine sebep olduğu bildirilmiştir (Singleton et al., 2010).

GSH'a benzer şekilde MT'ler hücre içerisinde bakır iyonlarını bağlayarak bakır iyonlarını depolar (Collins, 2020). Bu, hücre içi bakırın toksit etkilerinin önlenmesi için de önemli bir adımdır (Gaetke et al., 2014). Hücre içi artan bakır konsantrasyonlarında MT 'ler fazla bakırı detoksifiye ederek bakırın zararlı etkilerini engeller (Suzuki, Someya, Komada, & Ogra, 2002). MT' ler ayrıca hücre içi bakır konsantrasyonları azaldığında da devreye girer (Suzuki et al., 2002). Azalan bakır konsantrasyonlarında hücre içi bakır homeostazını korumak adına MT 'ler bakır iyonlarını bağlar ve bakırın hücreden atılımı engellenir (Suzuki et al., 2002).

SOD1 için bakır şaperon CCS' nin aktivite kaybı hücrelerde bakır konsantrasyonunun artmasına sebep olur (Miyayama, Ishizuka, Iijima, Hiraoka, & Ogra, 2011). Bu sonuca tepki olarak homeostazın korunması adına MT bakır bağlama aktivitesinin artışı, SLC31A1 ifadelerinin azalması ve ATP7A ifadelerinin artışı dikkat çekicidir (Miyayama et al., 2011). Bakır taşıyıcı ATPaz'lar için bakır şaperon ATOX1 eksikliğinde hücre içi bakır birikimi artar ve bu bozulmuş hücre içi bakır akışının bir sonucu olarak işaret edilir (Hamza et al., 2001). Ayrıca mitokondriyal bakır metabolizmasında rol oynayan SCO1 ve SCO2 bakır şaperonlardaki mutasyonlar ciddi bakır eksikliğine sebep olur (Leary et al., 2007).

X'e bağlı apoptoz inhibitörü XIAP, E3 ubiquitin ligaz aktivitesi aracılığı ile kaspaz inhibisyonuna neden olarak apoptozu baskılayan bir anti-apoptotik proteindir (Mufti, Burstein, & Duckett, 2007). Bunun ötesinde XIAP, COMM (bakır metabolizma geni MURR1) alanı içeren protein 1(COMMD1) aracılığı ile bakır homeostazında da rol oynar (Burstein et al., 2004). COMMD1'in ATP7B ile etkileşime girerek bakır ihracatını teşvik edebilecek bir molekül olduğu bildirilmiştir (Mufti et al., 2007). XIAP ise ubiquitin aktivitesi ile COMMD1'in degradasyonunu sağlayarak bakır ihracatının azalması ile hücre içi bakır konsantrasyonlarını düzenleyerek bakır homeostazına dahil olur (Burstein et al., 2004; Mufti et al., 2007).

Bu ifadeler bakır taşıyıcılar, bakır depolayan proteinler ve bakır şaperonlar da dahil birçok molekülün sıkı bir şekilde çalışarak hücre içi bakır homeostazını sağlayan kompleks mekanizmaları oluşturduğunu gösterir.

2.1.4. Hücre İçi Bakır Dishomeostazi ile İlişkili Hastalıklar

Bakırın hücresel süreçler için vazgeçilmez bir element olduğu düşünüldüğünde bakır homeostazının bozulmasının çeşitli hastalıklar ile ilişkili olabileceği gerçeği aşîkardır. Bu hastalıklar genetik olarak miras alınan hastalıkların yanı sıra çevresel

faktörlerle bozulan bakır homeostazı ile ilişkilendirilmiş hastalıkları kapsamaktadır. Bakır dishomeostazı ile ilişkili bilinen en ünlü kalıtsal hastalıklar Wilson ve Menkes hastalıklarıdır (Ala, Walker, Ashkan, Dooley, & Schilsky, 2007; Tümer & Møller, 2010). Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ve kanser, bakır ile ilişkilendirilmiş diğer hastalıklara örnektir.

Wilson Hastalığı

Wilson hastalığı 13. kromozomda bulunan ATP7B genindeki mutasyonlarla meydana gelen otozomal resesif bakır bağımlı kalıtsal bir hastalıktır (Ala et al., 2007). Wilson hastalarında, karaciğerden bakır ihracatında görevli ATP7B'nin mutasyonu karaciğerde bakır birikimine neden olur (Ala et al., 2007). Hastalarda akut karaciğer yetmezliği, kronik karaciğer hastalıkları ve nörolojik hastalıklar görülebilir (Ala et al., 2007). İlaç tedavilerinde fazla bakırın atılımına yönelik bakır şelatörler gibi ajanların kullanımı görülür (Ala et al., 2007).

Menkes Hastalığı

Menkes hastalığı ATP7A geninde mutasyonlar ile meydana gelen X kromozomuna bağlı resesif bir hastalıktır (Tümer & Møller, 2010). ATP7A geninde çoğunlukta intergenik mutasyonlar ve kısmi gen delesyonları görülmektedir (Tümer & Møller, 2010). Menkes hastalığında hücrelerden bakır ihracatı gerçekleştirilemez ve karaciğer ve beyin dışında çoğu dokuda anormal bakır birikimi söz konusudur (Tümer & Møller, 2010). Bağ dokusu disfonksiyonu, gelişmiş nörodejenerasyon ve sıra dışı birbirine dolaşık saçlar hastalığının ana belirtileridir (Tümer & Møller, 2010). Hastalığın en yaygın şiddetli formunda genelde yaşamın ilk üç yılından önce ölüm meydana gelir (Tümer & Møller, 2010).

Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı demansın bir türü olan ve ölüme yol açan nörodejeneratif bir hastalık şeklidir (Mathys & White, 2017; Squitti & Polimanti, 2013). Hastalığın patofizyolojisinde beyinde kümelenmiş amiloid β plakların birikimi ve nörofibriler yumak oluşumu temeldir (Ballard et al., 2011). Amiloid öncü proteinin (APP) daha toksik olan amiloid β peptidlerine bölünmesi amiloid β plaklarını oluşturur (Ballard et al., 2011).

Mikrotübüller ile ilişkili olan Tau proteinleri çözünür proteinlerdir fakat nörofibriler yumak oluşumunda ana bileşen olarak nöronların yapı ve işlevlerini

bozan, çözünmeyen agregatlar şeklinde birikir (Ballard et al., 2011). Alzheimer ile ilgili genetik temele bakıldığında Apolipoprotein E geninin epsilon 4 alelinin (Apo E4) Alzheimer riskini arttırdığı ifade edilir (Ballard et al., 2011). Ayrıca amiloid öncü proteinini kodlayan gendeki mutasyonlar amiloid β plakların oluşumunda yer alır (Ballard et al., 2011).

Alzheimer patofizyolojisi ile ilgili bazı mekanizmalar bakır iyonları ile ilişkilidir (Brewer, 2009). APP proteininde bakır bağlayıcı alan mevcuttur ve bakır ile etkileşim amiloid β plak oluşumuna katkıda bulunur (Mathys & White, 2017). Bakır iyonları nörofibriler yumak oluşumunu da destekler (Mathys & White, 2017). Alzheimer hastalığında oksidatif stres baskın özelliktir ve beyindeki olası bakır dishomeostazı oksidatif strese sebep olan ROS oluşumunu tetikler (Mathys & White, 2017). Bunun yanı sıra Apo E4'ün bakır ile etkileşime girdiği ve Apo E4 varlığının yüksek serum bakır konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Brewer, 2009; Gromadzka, Tarnacka, Flaga, & Adamczyk, 2020). Yapılan meta analizlerde sağlıklı bireylere kıyasla Alzheimer hastalarında serum bakır konsantrasyonlarının daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür (Bucossi et al., 2011; Squitti et al., 2014).

Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı başlıca beyindeki siyah maddede (Substantia Nigra) birçok vücut fonksiyonunda rol oynayan dopamini üreten nöronların kaybı ve nöron içi alfa-sinüklein proteinin agregasyonu ile karakterize bir nörodejeneratif hastalıktır (Poewe et al., 2017). Hastalığın patogeneğinde mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve nöroinflamasyon gibi mekanizmalar da yer alır (Poewe et al., 2017). Genetik temelli kusurlarla bağlantılı olabilmekle birlikte hastalığın oluşumunda çok faktörlü etkiler söz konusudur (Poewe et al., 2017).

Parkinson hastalığında bakırın rolü tam anlamı ile anlaşılmamıştır (Gromadzka et al., 2020). Parkinson hastalığında bakırın rolüne dair en belirgin ifade edilmiş yol ise bakırın alfa-sinüklein agregasyonu üzerindeki etkisidir (Lan, Chen, Chai, & Hu, 2016). Alfa-sinüklein proteinleri bakır iyonlarını bağlar ve bakır, alfa-sinüklein agregasyonunu destek olur (Ahmad, Burns, Fink, & Uversky, 2012). Ayrıca hücre dışında artan bakır konsantrasyonlarının nöronal hücre ölümüne katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (Lan et al., 2016).

Parkinson'un karakterizasyonunda dopamin üreten nöronların kaybı ifade edildiği üzere önemlidir ve bu hücre kaybında dopaminin kendisinin de rol oynayabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (Bisaglia & Bubacco, 2020). Bakırın dopaminin oksidasyonunu arttığı ve bunun H₂O₂ (Hidrojen peroksit) gibi toksik hidroksil radikallerini oluşumuna sebep olduğu ifade edilmiştir (Bisaglia & Bubacco, 2020). Bu şekilde dopamin, dopamin üreten nöronları oksidatif strese duyarlı hale getirebilir (Bisaglia & Bubacco, 2020).

Bakırın reaktif oksijen türleri üretme kabiliyetine sahip bir metal olduğu düşünüldüğünde Parkinson için bildirilen patolojik özelliklere katkıda bulunarak Parkinson hastalığının oluşuma sebep olabileceği ifade edilir (Gromadzka et al., 2020). Bu ifadelere ek olarak Parkinson hastalığında serum, beyin omurilik sıvısı ve beyinde bakır konsantrasyonlarında artışları bildiren çalışmalar mevcuttur (Lan et al., 2016).

Kanser

Bakır kanser süreçlerinde farklı mekanizmalar ile aktivite sergileyebilir. Hücre içi serbest bakırın ROS oluşturabilme kapasitesi kanser süreçleri ve bakır toksisitesinin kesişim noktasından biridir (Gupte & Mumper, 2009). Bu elementin hücre içi sinyal iletiminde oynadığı roller bu bağlamda öne çıkan bir diğer araştırma konusudur. Kanser karakteristiği olarak görülen metastaz, anjiyogenez, hücre proliferasyonu gibi süreçlerin kontrolünde rol oynayan PI3K/AKT yolağı, MAPK yolağı, ULK1/2 otofaji yolağı gibi hücre içi sinyal iletim sistemlerinde bakırın rolleri bildirilmiştir (Guo et al., 2021; Tsang et al., 2020; Turski et al., 2012).

PI3K/AKT yolağında AKT'nin fosforillenmesinden sorumlu PDK1 kinaz aktivitesi için bakır iyonları gereklidir (Guo et al., 2021). Dolaylı olarak bakırın AKT'yi aktive etmesi ise AKT'nin tümöre neden olan yolakları harekete geçirmesi ve tümöröjenezi desteklemesi ile sonuçlanır (Guo et al., 2021). Bu sonuçlar ile örtüşür şekilde bakır ithalatçı SLC31A1'in ifadesinin susturulması tümöröjenezin baskılanması ile sonuçlanır (Guo et al., 2021).

Bakırın MAPK yolağındaki rolleri bildirilmiştir. Burada, MEK1 kinaza bağlanan bakır ERK1 fosforilasyonunu sağlar (Turski et al., 2012). Hem normal fizyolojide hem de kanser süreçleri için önemli olan MAPK yolağının bakır aracılı aktivasyonu tümör gelişiminde roller üstlenir (Lelièvre, Sancey, Coll, Deniaud, &

Busser, 2020). Kanser gelişimini önlemeye yönelik stratejilerde bakırın hedeflenmesinin bu anlamda değerli olduğu doğrulanmıştır (Lelièvre et al., 2020).

MAPK sinyal yolağının bir parçası olan B-raf proto-onkojen, serin/treonin kinaz (BRAF) birçok kanser türünde başlıca V600E (Val 600→Glu) mutasyonu olmak üzere somatik nokta mutasyonları ile aktive olan bir protein kinazdır (Davies et al., 2002; Franklin, Aisner, Post, Bunn, & Garcia, 2014). BRAF, MAPK sinyal yolağında MEK1 ve MEK2 protein kinazları fosforiller ve bu sinyal molekülü hücre çoğalması için önemli bir aktördür (Brady et al., 2014; Franklin et al., 2014). BRAF^{V600E} mutasyonu tümörögenez lehine roller sergileyen onkojenik bir sinyaldir ve bu onkojenik sinyal için bakır gerekli bir elementtir (Brady et al., 2014; Franklin et al., 2014). Bakır ithalatçı SLC31A1 seviyelerinin azaltılması ile BRAF^{V600E} mutasyonuna sahip hücre hatlarında bildirilen tümör aleyhine sonuçlar bakır iyonlarının, BRAF^{V600E} onkojenik sinyalleri için ve dolayısıyla BRAF^{V600E} tümöröjenezi için gerekli olduğunu doğrular (Brady et al., 2014).

Reseptör tirozin kinazlar (RTK) büyüme faktörleri tarafından aktive edilir ve hücre proliferasyonu gibi metabolik süreçleri düzenler (F. He et al., 2019). RTK'lerin kanser hücre hatlarında büyüme faktörleri gibi ligandlarından bağımsız olarak bakır iyonları tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (F. He et al., 2019). RTK bakır aracılı aktivasyonunun RTK'lerin aşağı akış hedeflerinden Ras/MAPK ve PI3K/AKT gibi yolakların aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (F. He et al., 2019). Araştırılan kanser hücre hatlarında bakır aracılı RTK aktivasyonunun hücre göçünü ve hücre proliferasyonunu arttırdığı ifade edilmiştir (F. He et al., 2019).

Otofaji mekanizmasının sinyalizasyonunda görevli ULK1/2 kinazların aktivitesi için bakır iyonlarının gerekli olduğu ifade edilmiştir (Tsang et al., 2020). Otofaji, kanser hücrelerinin apoptoz süreçlerinden kaçmasını mümkün kılarak veya kanser hücreleri için gerekli olan enerjiyi kanser hücrelerinin kendilerinin oluşturduğu metabolik atıkları geri dönüştürerek sağlayarak kanser gelişimine katkı sağlayabilir (Xie, Yang, Gao, & He, 2023). Akciğer adenokarsinomunda bakır tarafından otofaji sürecinin indüksiyonunun tümör hücresi büyümesine ve hayatta kalmasına neden olması bakır iyonlarının kanser süreçlerindeki rollerine bir örnektir (Tsang et al., 2020).

Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1), genlerin hedef bölgelerine bağlanarak bağlandığı genin transkripsiyon seviyelerini düzenleyen bir transkripsiyon

faktörüdür (Wu, Zhang, & Kang, 2019). HIF-1'in aktivitesi için bir transkripsiyon kompleksi oluşturma noktasında bakır iyonları aktif rol oynar (W. Feng, Ye, Xue, Zhou, & Kang, 2009). Bakırın HIF-1 transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki rolleri HIF-1'in bir alt birimi olan HIF-1 alfa'nın hedeflediği genlerin promotor bölgelerine veya etki artırıcı (enhansır) bölgelerine bağlanmasını düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır (Wu et al., 2019). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) damar oluşumu olarak bilinen anjiyogenez süreçleri için düzenleyici bir sinyal molekülüdür (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). HIF-1 alfa'nın bakır aracılı aktivasyonu kanser hücrelerinde VEGF'nin ifade seviyelerini artırarak anjiyogenez süreçlerini teşvik eder ve böylece tümörjenezde katkıda bulunur (Rigiracciolo et al., 2015).

E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip anti-apoptotik bir protein olan X'e bağlı apoptoz inhibitörü XIAP proteini bakır iyonlarını bağlama özelliğine sahiptir (Mufti et al., 2006). XIAP proteinine bakır bağlanması proteinin konformasyonel değişimine sebep olur ve sonuçta proteinin anti-apoptotik etkileri azalır (Mufti et al., 2006). XIAP'ın bakır aracılı inhibisyonu ise tümör gelişimini teşvik eder (Xie et al., 2023). Ayrıca XIAP proteinin bazı kanser türlerinde ifade düzeylerinin artmış olduğu ve bu proteinin kanser gelişimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Hussain et al., 2017; Mizutani et al., 2007).

Bakırın kanser gelişimi veya kanser ilerlemesi için çeşitli mekanizmalarda roller oynaması ile tutarlı olarak birçok çalışmada kanser hastalarının serum örneklerinde ve aynı zamanda tümör dokularında normale kıyasla artan bakır konsantrasyonu bildirilmiştir (Gupte & Mumper, 2009). Prostat kanseri hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla serum bakır seviyeleri önemli düzeyde artış göstermektedir (Saleh, Adly, Abdelkhalik, & Nassir, 2020). Yine prostat kanserinde, orta şiddetli hastaların dokularında sağlıklı kontrollere kıyasla 1,6 kat fazla bakır konsantrasyonları ve daha şiddetli evrede bulunan hastaların dokularında ise sağlıklı kontrollere kıyasla yaklaşık 2 kat fazla bakır konsantrasyonları ölçülmüştür (Denoyer, Clatworthy, Masaldan, Meggyesy, & Cater, 2015). Akciğer kanseri ve bakır arasındaki ilişkileri gösteren bir meta analizde, elde edilen verilere göre birçok çalışmada birbiri ile tutarlı olarak akciğer kanseri hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla artan serum bakır konsantrasyonları bildirilmiştir (X. Zhang & Yang, 2018). Karaciğer kanseri hastalarının serumlarında ise artan bakır konsantrasyonları hastalığın kötü seyri ile

paraleldir (Fang et al., 2019). Meme kanseri hastalarında serum bakır konsantrasyonlarında sağlıklı kontrollere kıyasla artış, bunun yanında iyi huylu (benin) meme kanseri hastalarında meme kanseri hastalarına kıyasla serum bakır konsantrasyonlarında azalmalar bildirilmiştir (Y. Feng et al., 2020). Bu sonuçların tam tersine kolorektal kanser hastalarının serumlarında ölçülen bakır konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere kıyasla düşük seviyelerde seyrettiği de görülmüştür (Khoshdel et al., 2016).

2.2. Kronik Bakır Maruziyeti

Canlılar çeşitli yollar ile bakırın yüksek dozlarına maruz kalarak yaşamlarının ilerleyen safhalarında ciddi sorunlar ile karşı karşıya kalabilir. Bakır genellikle volkanik patlamalar, orman yangınları, rüzgarlar gibi doğal oluşumlar ile çevreye yayılabileceği gibi endüstriyel faaliyetler, tarım ilaçları, petrol, doğal gaz vb. yakıtların yanması şeklinde insan aktiviteleri sonucu da doğaya karışabilir (Deng et al., 2023; Rigracciolo et al., 2015). Endüstriyel faaliyetler arttıkça doğaya salınan bakır miktarı artar ve bununla orantılı olarak bakır maruziyeti olguları da artış gösterir (Deng et al., 2023). Çevreye salınan bakır, içme suları ve tarım alanları gibi yaşam için önemli olan kaynakları kontamine ederek besin zincirine dahil olur (Tian et al., 2015). Ancak çevreye yayılan bakır her zaman maruziyete sebep olmayacağı gibi direkt olarak yeme, içme, soluma ve deri teması gibi yollar bakır maruziyetine sebebiyet verir (Dorsey & Ingberman, 2004). Genellikle süt ürünleri, şeker ve marul gibi besinler düşük bakır içeriğine sahipken kabuklu yiyecekler, çikolata, baklagiller ve mantarlar ise yüksek bakır içeriğine sahip besinlere örnektir (Collins & Klevay, 2011). Besinlerin yanı sıra bakır, doğum kontrol hapları, takviye vitaminler ve mineraller ile de vücuda alınır (Gaetke et al., 2014). Bakır ayrıca yemek pişirilen kaplar, su boruları, medikal aletler vb. insanların etkileşimde olduğu nesnelerde de bulunur (Gaetke et al., 2014)

Bakır maruziyetinin sebep olduğu olumsuz sonuçları bakıra maruz kalma süresi, maruz kalma şekli, maruz kalan kişinin genetik özellikleri gibi birçok etken etkilemektedir (Dorsey & Ingberman, 2004). Örneğin içme sularından veya yiyeceklerden aşırı miktarda bakırı vücuduna alan bireyler yüksek bakır toksisite riski altındadır (Uauy, Maass, & Araya, 2008). Ayrıca fazla bakırın vücuttan atılımı noktasında rol oynayan safra yolunun olgunlaşmamış olduğu ve bakırın vücuda alım şekli olan bağırsak emiliminin daha gelişmiş olduğu yeni doğanlarda ve bebeklerde bakır toksisitesi riski yüksektir (Collins & Klevay, 2011). Oldukça toksik seviyelerde

maruz kalınan bakır akut toksisiteye sebep olurken daha uzun periyotlarda ve sürekli olarak, akut toksisiteye sebep olan miktardan daha az düzeylerde bakıra maruz kalmak ise kronik bakır maruziyetine sebep olur (Meredyth Jones & van der Merwe Bvs, 2008). Akut maruziyet sonucu oluşan bakır toksisitesi şiddetli kusma, ishal, sarılık gibi belirtiler gösterir ve idrar ve kanda bakır seviyesi ölçümünün yanında gaitada bakır seviyelerinin saptanması akut bakır toksisitesini değerlendirmek için kullanılan yöntemler olabilir (Royer & Sharman, 2020).

Tesisatçılar, kaynakçılar, madenciler gibi çalışma alanlarında bakır ile temas halinde bulunan meslek gruplarında çalışan bireylerde bakıra maruz kalma riski artar (Dorsey & Ingberman, 2004; Gaetke et al., 2014). Bu gibi endüstriyel alanlarda çalışmak sürekli ve uzun bir süreçte meydana gelen maruziyeti beraberinde getirir ve bireylerde orta düzeyde bakır maruziyeti meydana gelir (Saha, Karnik, Sathawara, Kulkarni, & Singh, 2008). Bu çalışma koşullarında istihdam eden bireyler havada bulunan bakırı veya tozu soluyarak ve direkt deri teması yoluyla bakıra maruz kalabilir (Dorsey & Ingberman, 2004). Kronik bakır maruziyetinin etkileri, akut bakır maruziyetinde olduğu gibi görünür olmadığından ve uzun sürelerde ortaya çıkabileceğinden ötürü bu tip maruziyet şeklinin takibi önemli bir konudur (Saha et al., 2008).

Maruziyet kaynaklı veya herhangi bir şekilde oluşan bakır toksisitesinin teşhisi için kan, idrar ya da saç analizleri tercih edilen metotlardır (Gaetke et al., 2014). Serumdaki bakır düzeylerinin ve bakır bağlayan protein olan seruloplazmin değerlerinin ölçülmesi ise en sık tercih edilen metotlardır (Gaetke et al., 2014). Fakat serum bakır düzeylerinin ölçülmesi gibi maruziyet belirteçleri yalnızca kişilerde klinik belirtilere yol açabilecek düzeyde ve sürede oluşan bir maruziyette etkili olabilir ve kişilerin bakır metabolizmalarındaki farklılıklarından ötürü etkin sonuçlar vermeyebilir (Araya et al., 2006; Saha et al., 2008). Yine seruloplazmin düzeyleri de bazı hasta gruplarında ve cinsiyetler arası farklı ifade seviyelerine sahip olabileceğinden kronik bakır maruziyeti sonucu artan bakır konsantrasyonları için güvenilir bir biyobelirteç olarak görülmez (Danzeisen et al., 2007). Bu gibi maruziyet belirteçleri uzun vadede etkiler sergileyebilecek, daha hassas düzeyde bakır değişikliklerinin izleniminde faydalı olmayabilir (Araya et al., 2006).

Yapılan birçok çalışmada bakır konsantrasyonundaki değişimleri ölçmek için biyobelirteç olarak araştırılmış ve test edilmiş olan eritrosit SOD1 ve trombosit CCO'

nun bu bağlamda güvenilir biyobelirteçler olmadıklarının ispat edildiği ifade edilmektedir (Danzeisen et al., 2007). Bakır bağlayıcı bir enzim olan lizil oksidazın da bakır konsantrasyonlardaki değişim için biyobelirteç olma uygulamalarının sınırlı olduğu bildirilmiştir (Danzeisen et al., 2007). CCS'nin ise bakır konsantrasyonlarındaki değişiklikleri saptayabilmek adına umut verici bir biyobelirteç olabileceğinin altı çizilmiştir (Danzeisen et al., 2007).

2.2.1. Kronik Bakır Maruziyeti ve Toksisite

Biyolojik sistemlerde bulunduğu iki oksidasyon durumundan ötürü (Cu^{+2} ve Cu^{+1}) bakır, toksik etkilere sebep olabilen redoks aktif bir ağır metaldir (Banci et al., 2010; Tsang et al., 2021). Redoks aktif özellikleri bakırın ROS oluşturmaya sebep olabilir (Tsang et al., 2021). ROS en az bir oksijen atomu ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, çeşitli metabolik yollar için sinyal molekülü olan aynı zamanda biyomoleküllerde hasara sebep olabilen reaktif kimyasallardır (Jakubczyk et al., 2020; Zandalinas & Mittler, 2018). Bakırın bu toksik özelliklerinden ötürü normal işleyişe sahip bir organizmada hücreler bakırın daima bir proteine veya küçük biyomoleküllere koordine olmasını sağlar (Banci et al., 2010; Wittung-Stafshede, 2021). Herhangi bir moleküle bağlı olmayan bakır iyonları ise hücre içerisindeki serbest bakırı temsil eder ve bu bakır şekli canlılar için oldukça toksik niteliktedir (McMillin et al., 2009).

Bakırın sebep olduğu toksisite için en güçlü aday bakır iyonlarının ROS oluşturabilme yetenekleri ve oksidatif strese sebep olmalarıdır (Gaetke et al., 2014) ROS, DNA, protein ve lipitlere karşı reaktivite gösterir (Glasauer & Chandel, 2013). Hidroksil radikalleri ($\text{OH}\cdot$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bunlara örnektir (Glasauer & Chandel, 2013). Normal fizyolojide ROS kaynaklı toksisite antioksidan savunma sistemi tarafından engellenir fakat üretilen ROS miktarı antioksidan savunmayı aştığında oksidatif stres meydana gelir ve nükleotitler, proteinler ve lipitlerde oksidatif hasarın meydana gelmesiyle birlikte çeşitli patolojik durumlar oluşabilir (Bandyopadhyay, Das, & Banerjee, 1999; Pizzino et al., 2017).

Cu^{+2} ve Cu^{+1} iyonlarının her ikisi de redoks reaksiyonlarına katılım sağlayabilir (Gaetke et al., 2014). Örneğin Cu^{+2} iyonları bir indirgeyici ajan varlığında Cu^{+1} iyonlarına indirgenebilir ve Cu^{+1} H_2O_2 ile reaksiyona girerek oldukça güçlü bir oksitleyici radikal olan hidroksil radikallerinin oluşumuna sebep olabilir (Bremner, 1998). Hidroksil radikalleri gibi zararlı ROS'lar DNA çift zincir kırıkları, DNA

zincirinde bazların oksidasyonu ile 8-oksoguanin, 8-oksoadenin, timin glikoller gibi yapılar, proteinlerin amino asitlerinde kalıcı değişiklikler, lipid peroksidasyonları gibi hasarlara sebep olur (Cervantes-Cervantes, Calderón-Salinas, Albores, & Muñoz-Sánchez, 2005; Gaetke et al., 2014). Oksidatif hasar mesleki ortamlarda ve çevresel olarak kronik bakır maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir (Gaetke & Chow, 2003).

Mesleki ortamlarda bakıra maruz kalma sonucu oluşan toksik etkilerin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Yüksek bakır maruziyeti riski altında çalışan bakır işleme tesisi çalışanlarında demografik özellikler açısından eşleştirilmiş kontrol grubu ile kıyaslandığında bakır maruziyetinin sonuçları açıkça görülmektedir (Kumar et al., 2016). Yapılan çalışmada bakır işleme tesisinde çalışan bireylerin serumlarında kontrol gruplarına göre artan malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri ve azalan GSH seviyeleri bildirilmiştir (Kumar et al., 2016). Bunun yanı sıra çalışanlarda solunum fonksiyon göstergelerinin düşük olduğu görülmüştür (Kumar et al., 2016). Lipid peroksidasyonunun ürünlerinden biri olan MDA ve antioksidan molekül olan GSH oksidatif stres için ve 8-OHdG DNA hasarı için belirteçlerdir (Gaweł, Wardas, Niedworok, & Wardas, 2004; Mytilineou, Kramer, & Yabut, 2002; Valavanidis, Vlachogianni, & Fiotakis, 2009). Bu sonuçlar bakıra maruz kalan bireylerde bakır maruziyetinin bir sonucu olarak oksidatif hasarın artışının işaret edilebileceğini gözler önüne serer (Kumar et al., 2016). Bir bakır izabe tesisinde çalışan bireyler ve sağlıklı kontroller arasında yapılan değerlendirmelerde ise plazma MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark görülmezken izabe tesisi çalışanlarında DNA hasarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür (Shahrokhi et al., 2021). Benzer bir endüstriyel alanda çalışan bireylerin sağlıklı kontrollere kıyasla periferik kan lenfositlerinde artan DNA hasarı seviyeleri bildirilmiştir (De Olivera et al., 2012). Bu sonuçlara benzer şekilde bir bakır dökümhanesinde çalışan bireylerde de sağlıklı kontrollere kıyasla somatik hücrelerde artan DNA hasarı seviyeleri rapor edilmiştir (Palus et al., 2005). Bir bakır işleme tesisinde çalışan bireylerde ise kontrol grubuna kıyasla ölçülen DNA hasar seviyeleri ve idrar 8-OHdG seviyeleri artmış ve bu sonuçlar bakır maruziyeti kaynaklı oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (Da, 2019). Bir bakır toplama fabrikası işçilerinde oksidatif hasarın arttığı ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ile ilişkilendirilen interlökin-2 (IL-2) seviyelerinin azaldığı, interlökin-4 (IL-4) seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Farsipour, Faghihi-Zarandi, Mozaffari, & Karami-Mohajeri, 2019). Mesleki

maruziyet dışında, bakır içeren rahim içi doğum kontrol araçlarını kullanan kadınlarda da bakır maruziyet değerlendirmeleri yapılmıştır (Shubber, Amin, & El-Adhami, 1998). Buna göre özellikle iki yıldan uzun bir süre zarfında bu araçları kullanan bireylerde kromozom anomalileri belirlenmiş ve bu araçların uzun süre kullanımı ile paralel olarak artan DNA hasarı seviyelerinin mevcudiyeti bildirilmiştir (Shubber et al., 1998).

Kronik bakır maruziyeti sonucu hücresel seviyelerde meydana gelen toksisitelerin yanı sıra bakır ağır metale uzun süre maruz kalmak kanser ile de ilişkilendirilmiştir. Örneğin bakır madeninde çalışan bireylerde mesleki maruziyetin bir sonucu olarak kanser, bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (R. Chen, 1996). Bakır madeninde oluşan maruziyet ve kanser riski arasındaki ilişki maruz kalma süresi ile pozitif bir ilişkiye sahiptir (R. Chen, 1996). Bakır madeni çalışanlarında maruziyet süresi ile paralel olarak akciğer kanserinden ölüm riski artmaktadır (R. Chen et al., 1993). Ayrıca bakır madeninde toza maruz kalmak akciğer kanseri ölümlerinin artması ile ilişkilendirilmiştir (R. Chen et al., 1993).

2.3. Bakır ve Hücre Ölüm Yolakları

2.3.1. Apoptoz

Apoptoz, organizmalarda normal bir fizyolojik süreç olarak işleyen ve nekroz gibi hücre ölüm şekillerinden ziyade programlı bir hücre ölüm şekli olarak ifade edilir (Xu, Lai, & Hua, 2019). Embriyonik gelişim ve hücre yenilenmesi gibi süreçler sırasında ve kimyasallar veya radyasyon gibi uyaranlar ile meydana gelen hücre ölümü apoptozu temsil etmektedir (Xu et al., 2019). Kaspazlar olarak bilinen proteazlar ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri apoptoz süreçleri için anahtar proteinlerdir (Cohen, 1997; Reed, 1998). İç (intrinsic) ve dış (extrinsic) olmak üzere iki farklı apoptotik yol mevcuttur (Voss & Strasser, 2020). Apoptozun dış yolu, hücre dışı bir ligandla etkileşimi ile ölüm sinyallerini hücre içi boşluğa ileten tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesi transmembran reseptörleri ile başlatılır (Xu et al., 2019). Apoptozun içsel yolu ise hücresel stres ve sitotoksik etkiler ile üretilen hücre içi sinyallerin tetiklediği mitokondriyal bozulmaların oluşumu ile karakterize edilir (Xu et al., 2019). Bcl-2 ailesi üyeleri metabolik stres, DNA hasarı, sitotoksikite gibi içsel apoptoz yolunun başlatılmasından ve hücresel olaylara verilen yanıtın düzenlenmesinden sorumludur (Voss & Strasser, 2020). Apoptozun başlatılması noktasında farklı yollar mevcut olsa da temelde bu süreçlerde kaspazların aktivasyonu meydana gelir ve bu

süreçler fagositozlar tarafından yutulan apoptotik cisimlerin (ApoBD) oluşumu noktasında birleşir (Xu et al., 2019). Apoptotik cisimlerin oluşumunun yanı sıra apoptoz mekanizmasının farklı evrelerinde apoptoza uğrayan hücreler büzülür, kromatin yoğunlaşır, plazma zarları ve nükleer zarlar yırtılır (Voss & Strasser, 2020; Xu et al., 2019).

Bakırın memeli hücrelerinde apoptozu indüklediğine dair kanıtlar mevcuttur (Kawakami, Inagawa, Hosokawa, Saito, & Kurasaki, 2008). PC12 sıçan hücre hatlarının bakırın artan dozları ile muamelesi sonucunda bakıra maruz bırakılan hücrelerde apoptotik belirtilerin arttığına dair bulgular elde edilmiştir (Kawakami et al., 2008). Buna göre bakıra maruz kalan hücrelerde hücre canlılık oranı azalmış, çekirdek DNA fragmentasyonu artmıştır (Kawakami et al., 2008). Sonuçlara göre bakır muamelesi sonucu Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax proteinin ifade düzeylerinin artması ve ROS seviyelerinin artması gibi değişiklikler apoptotik süreçlerin oluşumunu tetiklemiştir (Kawakami et al., 2008).

Bakır iyonlarını bağlayabilen anti-apoptotik XIAP proteini bakır iyonları ile bağladığında bu durum proteinin konformasyonel değişimine neden olur (Mufti et al., 2006). Bakır aracılı konformasyonel değişime uğrayan XIAP kaspaz inaktivasyonu aktivitesini sergileyemez ve XIAP'ın apoptozu inhibe etme özelliği engellenir (Mufti et al., 2006). Artan bakır konsantrasyonları XIAP aracılığı ile hücreleri apoptoza duyarlı hale getirerek apoptotik süreçlere destek olur (Mufti et al., 2006).

Belirli bir periyotta farklı bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan farelerin hepatositlerinde bakır maruziyeti kaynaklı artan ROS seviyelerinin mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu ve bunun da içsel apoptotik yolun aktivasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (H. Liu et al., 2020). Ayrıca yapılan çalışmada bakıra maruz bırakılan farelerde TNF protein ailesine ait üyelerin arttığı ve böylece bakırın fare hepatositlerinde dışsal apoptotik yolun aktivasyonunu da tetiklediği ifade edilmiştir (H. Liu et al., 2020).

Fare pro-B hücre hattı BA/F3p'nin Cu^{+2} iyonları ile muamelesinin Bcl-2 ailesi üyesi Bax protein seviyelerini ve ROS oluşumunu arttırarak bahsi geçen hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Zhai et al., 2000).

Bir fare germ hücre hattının bakır ile muamelesi sonucunda bakırın oksidatif stresi arttırarak mitokondriyal bozulmalara sebep olduğu ve sonuçta apoptozu

arttırdığı sonuçları bakıra maruz kalmanın erkek üreme hücrelerinin sayısını azalttığını işaret eder (Kang et al., 2019).

Sıçanların bakır ile tedavisi sonucunda sıçan böbreklerinde otofaji ve apoptotik yolların aktivasyonu bildirilmiştir (Wan et al., 2020). Buna göre bakıra maruz kalan sıçanların böbrek dokularının incelenmesi sonucu içsel apoptotik yolağın indüklendiği ifade edilmiş ve ayrıca bakırın apoptotik teşviki oksidatif stresi indüklemeye potansiyeline bağlı olabileceği tahmin edilmiştir (Wan et al., 2020).

2.3.2. Ferroptoz

Canlılar için gerekli bir element olan demir, hücre içi konsantrasyonları aşırı miktarlara ulaştığında hücre ölümü gibi mekanizmalar aracılığı ile hasara yol açabilir (Tang & Kroemer, 2020). 2012 yılında keşfedilen ve bilinen hücre ölüm yollarından birçok yönden farklı olan ferroptoz, temelde demire bağlı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmıştır (Dixon et al., 2012). Ferroptozla dair ilk keşifler ise RAS ifade eden kanser hücreleri için öldürücü etkiye sahip ajanlar olan erastin ve RSL3'ün keşfi ve bu öldürücü etkinin demir şelatlayıcı ajanlar tarafından engellenebileceği bilgilerini kapsar (Dolma, Lessnick, Hahn, & Stockwell, 2003; Yagoda et al., 2007; W. S. Yang & Stockwell, 2008). Ferroptozla uğrayan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşumu, organellerde şişme gibi etkiler görülmezken, hücre zarı yoğunluğunun arttığı, mitokondri hacminin azaldığı ve mitokondriyal iç zarın kaybolduğu veya azaldığı bildirilmiştir (Dixon et al., 2012).

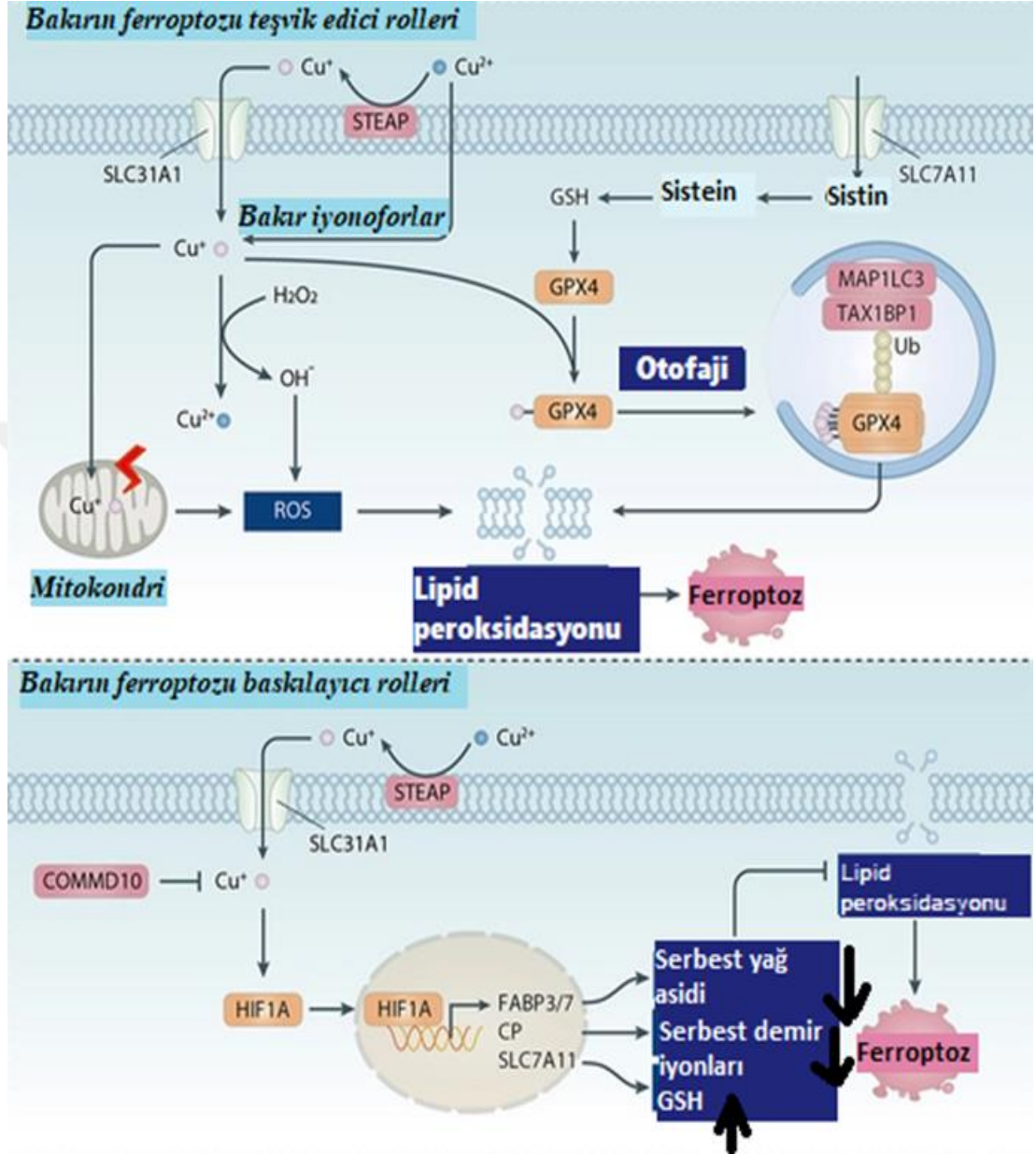
Lipitlerin ROS aracılı bozulmasını ifade eden lipit peroksidasyonu ferroptoz için ana tetikleyici oluşumdur (Tang & Kroemer, 2020). Demirin hücre içi transfer ve depolama süreçlerinde görevli olan protein sistemlerinin düzensizliği sonucu artan hücre içi demirin oluşturduğu ROS ve oksidatif metabolizma sonucu üretilen ROS, ferroptozu teşvik eder (Dixon et al., 2012; Tang & Kroemer, 2020). Ferroptozu teşvik eden erastin, sistin/glutamat taşıyıcı proteinini inhibe ederek antioksidan savunmada görevli GSH sentezini engeller ve bunun sonucunda antioksidan aktivitede meydana gelen azalma ve ROS artışı lipit peroksidasyonunu teşvik ederek ferroptozu tetikler (J. Li et al., 2020). Lipit peroksidatlarının oluşumunu engelleme aktivitesine sahip glutatylot peroksidaz 4 (GPX4)'ün RSL3 tarafından inhibisyonu da ferroptozu teşvik eden etkilerden biridir (J. Li et al., 2020). Sistin/glutamat taşıyıcı sisteminin inhibisyonu ve demir taşıyıcıların (transferrin ve laktotransferrin) aktivasyonu ferroptozun dışsal (extrinsic) yolunu kapsarken, antioksidan enzimlerin inhibisyonu ferroptozun içsel

(intrinsic) yolunu kapsar (Tang & Kroemer, 2020). Ekstrem sıcaklık koşulları, hipoksi, radyasyon ve kimyasallar gibi stres koşulları ferroptotik hücre ölümünü tetikleme potansiyeline sahiptir (Tang & Kroemer, 2020).

Demir homeostazındaki değişiklikler ferroptozu destekleyebildiğinden ötürü bakır dahil birkaç ağır metal, demir homeostazını etkileyerek ferroptozu teşvik edebilir (Aschner et al., 2022). Eksojen bakırın antioksidan savunmada görevli GPX4'ün sistein kalıntılarına direkt olarak bağlanma yolu ile GPX4 ubiquitinasyonunu ve agregasyonunu artırarak GPX4'ün otofaji yolu ile parçalanmasını teşvik ettiği ve bu yolla ferroptozu tetiklediği bildirilmiştir (Xue et al., 2023) (Şekil 2.8). Aynı çalışmada bakır şelatörlerin ferroptozu baskıladığı sonuçlarına ulaşılmıştır (Xue et al., 2023). Antitümör aktivitesine sahip disülfiram/bakır reaktiflerinin nazofaringeal karsinom hücrelerinde gösterdiği antitümör aktiviteler ferroptoz yolağının tetiklenmesi ile eşleştirilmiştir (J. Li et al., 2020). Hepatoselüler karsinomda disülfiram/bakır reaktiflerinin ROS oluşumunu arttırabileceği, mitokondriyal morfolojiyi bozabileceği, lipid peroksidasyonunu arttırabileceği ve nihayetinde ferroptozu teşvik edebileceği ifade edilmektedir (Ren et al., 2021). Bakırın fare sinir hücre hattında ferroptozun karakteristiği olan lipid peroksidasyonunu arttığı ve ferroptoz mekanizması ile eşleşen erastin kaynaklı hücre ölümünü güçlendirdiği görülmüştür (Maher, 2018). Ferroptozu teşvik edici özelliklerin ek olarak bakırın ferroptotik hücre ölümünü baskıladığına dair kanıtlar mevcuttur. Bakır metabolizması ile ilgili bir protein olan COMMD10 hücre içi bakır konsantrasyonlarını azaltma kabiliyetine sahiptir (Mi Yang et al., 2022). Karaciğer kanseri hücrelerinde COMMD10'un azalan ifadesine yanıt olarak hücre içi bakır konsantrasyonları artar (Mi Yang et al., 2022). Artan bakır konsantrasyonları sonuçta sistin/glutamat taşıyıcısının bileşeni SLC7A11 ve feroksidaz aktivitesine sahip seruloplazmin genlerinin ifadelerini arttıran HIF1-alfa ifadesinin artmasına aracılık eder (Mi Yang et al., 2022). Artan SLC7A11 ifadesi hücre içi glutatyon seviyelerini artırır ve bu lipid peroksidasyonunun azalması ile sonuçlanır (Mi Yang et al., 2022). Ayrıca hücre içi artan bakır seviyeleri, demir konsantrasyonlarında azalma ile sonuçlanan seruloplazmin seviyelerinin artmasını teşvik eder (Mi Yang et al., 2022). Bu ifadeler karaciğer kanserinden artan bakır konsantrasyonlarının ferroptozu baskıladığı sonucunda birleşir (Mi Yang et al., 2022).

Ayrıca HIF1-alfanın hedefi olan yağ asidi bağlayıcı proteinleri 3 ve 7 (FABP3/7) ferroptozu baskılama aktivitesi sergiler ve bakır iyonlarının HIF1- alfa

ifadesini arttırdığı düşünüldüğünde bakırın FABP3/7 aracılığıyla da ferroptozu baskılayabileceği hipotezi yürütülür (Xue et al., 2023; Minghua Yang et al., 2019) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Bakır ve ferroptoz ilişkisi (Xue et al., 2023)

2.3.3. Kuproptoz

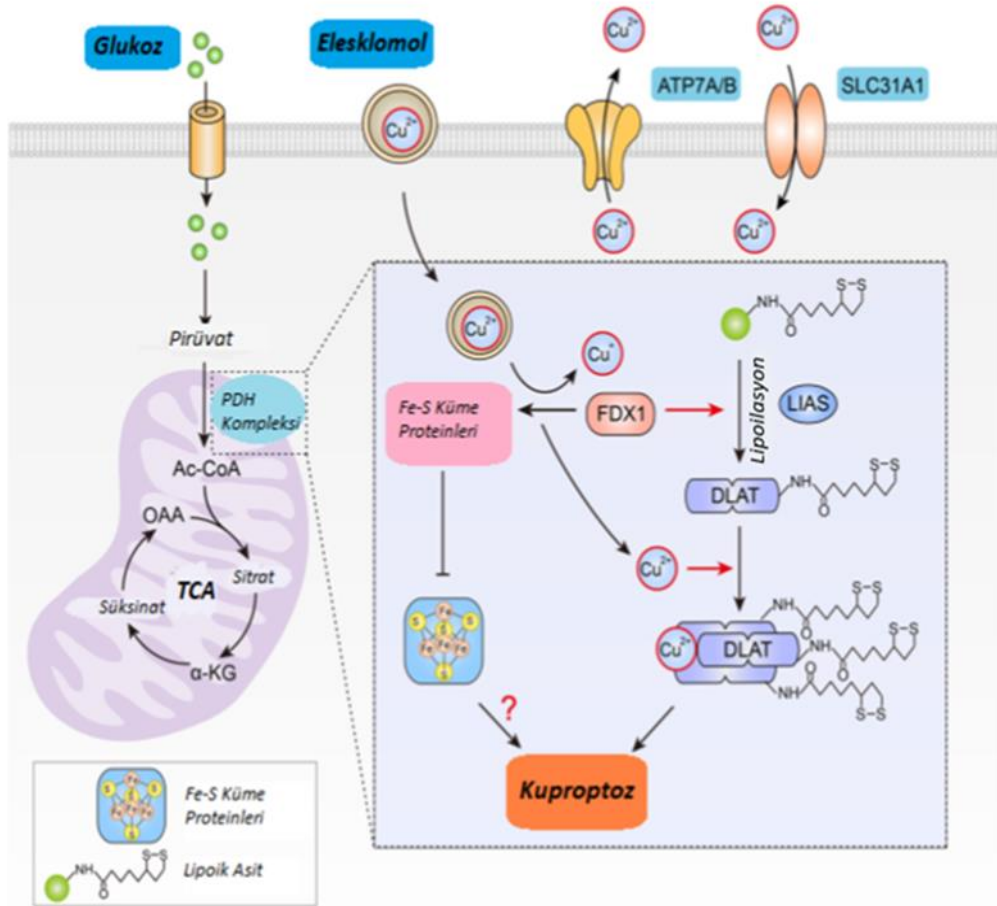
Demir bağımlı hücre ölüm şekli ferroptozdan sonra bakır bağımlı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanan kuproptoz yolağı ile metallerin hücre ölüm yollarına dahililiyetine dair kanıtlar artmıştır. Kuproptoz yolağı 2022 yılında Tsvetkov ve arkadaşları tarafından keşfedilen ve temelde hücre içinde biriken bakır iyonlarının yol

açtığı toksisite olarak hücrelerin ölüme sevk edilmesini ifade eden yeni bir hücre ölüm yolağıdır (Şekil 2.9). Kuproptoz mekanizmasını sunan araştırmacılar çeşitli deneyler sonucunda elde ettikleri bulgular ışığında bakır kaynaklı toksisitenin ROS oluşumu ile sınırlı olmadığını göstermiştir (Tsvetkov et al., 2022).

Araştırmacılar ilk olarak bakır iyonlarına bağlanarak hücre içi ortama iletebilen bir bakır iyonofor olan elesklomolün hücreleri ölüme sevk ettiğini keşfetti. Yapılan deneyler ile elesklomol kaynaklı hücre ölümünün bilinen hücre ölüm yollarından farklı özellikler sergilediği görüldü. Elesklomol kaynaklı hücre ölümü için bakır iyonlarının gerekli olduğu ve elesklomolün tetiklediği hücre ölüm şeklinin hücre içinde artan bakır birikimine bağlı olduğu bildirildi. İleri analizlerle mitokondriyal solunuma bağımlı hücrelerin bu hücre ölüm şekline daha hassas olduğu, mitokondriyal solunumun bakır bağımlı hücre ölüm şekli için gerekli olduğu ve TCA bileşenlerinin bakır tarafından hedeflenerek hücre ölümünde rol oynadığı keşfedildi. Bakırın rol oynadığı hücre ölümünün mekanizmasını ayrıntılı olarak anlamaya yönelik yapılan deneylerde FDX1 ve protein lipoilasyonunun bakır aracılı hücre ölümü için anahtar düzenleyiciler olduğu ifade edildi (Tsvetkov et al., 2022). FDX1, Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeme aktivitesi sergileyen bir redüktaz enzimidir (Tsvetkov et al., 2019). Protein lipoilasyonu yalnızca TCA döngüsü ile ilişkili enzimlerde meydana geldiği bilinen, yüksek oranda korunmuş lizin gruplarına lipoik asitin bağlanması ile oluşan bir çeviri sonrası (post-translasyonel) modifikasyondur ve bu modifikasyon proteinlerin enzimatik reaksiyonları için gereklidir (Cronan, 2016; Tang, Chen, & Kroemer, 2022). Çalışmada FDX1'in protein lipoilasyonunu düzenleme potansiyeline sahip olduğu bildirildi (Tsvetkov et al., 2022).

Bakırın hücre ölümündeki asıl rolüne odaklanıldığında bakır iyonlarının lipoillenmiş DLAT proteinine bağlandığı ve DLAT proteininin oligomerizasyonuna yol açtığı görüldü (Tsvetkov et al., 2022). DLAT proteini E1, E2 ve E3 olmak üzere üç enzimatik yapıdan oluşan ve pirüvatın Asetil Koenzim A'ya dönüşümünü katalizleyen pirüvat dehidrojenaz kompleksinin (PDH) bir enzimatik alt birimidir (Thelen et al., 1999). PDH kompleksinin E2 birimini temsil eden DLAT, pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu tarafından üretilen asetil gruplarının Asetil Koenzim A'yı oluşturmak üzere Koenzim A'ya iletimini kataliz eder (Thelen et al., 1999). Yapılan deneyler sonucunda kuproptoz olarak adlandırılan bakır bağımlı hücre ölüm yolağının, hücre içi artan bakır konsantrasyonlarının lipoillenmiş DLAT proteinlerinin

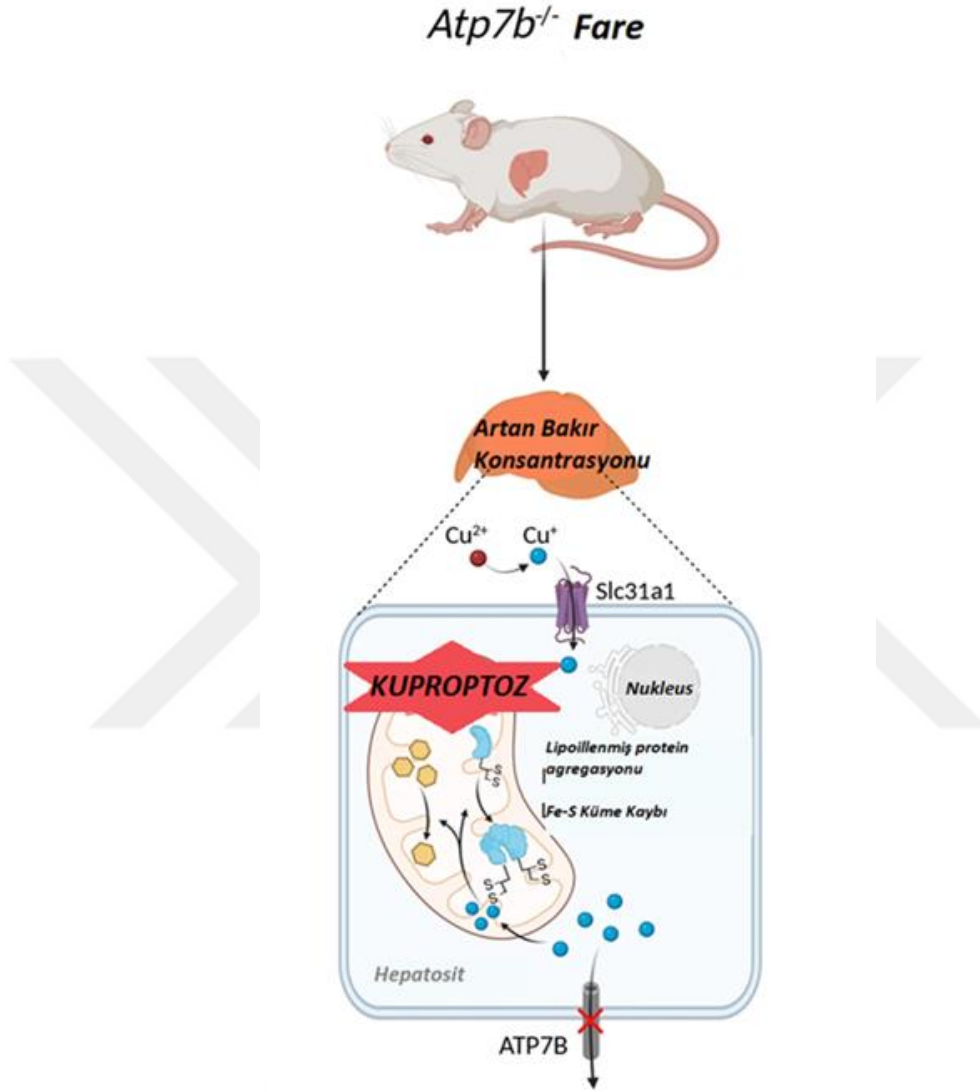
agregasyonunu arttırarak proteo-toksisite oluşturduğu ve sonuçta hücreleri ölüme sevk ettiği bir mekanizmaya sahip olduğu görüldü. Ayrıca araştırmacılar tarafından FDX1'in DLAT lipoilasyonundan öte Fe-S küme proteinlerinin oluşumunu da azalttığını ifade edildi. Fakat Fe-S küme proteinlerinin kuproptotik hücre ölümüne dahil olup olmadığı belirlenmedi (Tsvetkov et al., 2022).



Şekil 2.9. Kuproptoz mekanizması (Y. Wang, Zhang, & Zhou, 2022)

Elesklomolün dahil olduğu bakır kaynaklı hücre ölüm mekanizmasının elesklomol olmadan doğal olarak artan hücre içi bakır konsantrasyonu ile meydana gelip gelmediği de araştırmacılar tarafından araştırıldı (Şekil 2.10). İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde bakır taşıyıcı SLC31A1 geninin ifadesi artırıldı (hücre içi bakır konsantrasyonları arttı) ve bu koşullar altında da kuproptotik ölümün meydana geldiği görüldü. Ayrıca ATP7B geninin susturulması ile oluşturulmuş fare Wilson hastalığı modelinde de artan hücre içi bakır konsantrasyonları ile birlikte farelerde kuproptotik

ölüm meydana geldi. Bu sonuçlar ile birlikte Tsvetkov ve arkadaşları tarafından hücre içerisinde artan bakır konsantrasyonlarının proteo-toksisiteye neden olarak hücreleri ölüme sevk ettiği yeni bir bakır toksisitesi türü olarak kuproptoz hücre ölüm yolağı literatüre kazandırıldı (Tsvetkov et al., 2022).



Şekil 2.10. Doğal koşullarda kuproptoz yolağı (L. Chen et al., 2022).

2.3.3.1. Kuproptoz ile İlişkili Genler

FDX1

FDX1 geni insanlarda 11. kromozomda konumlanan ve Fe-S kümesi barındıran bir Fe-S proteinini kodlayan gendir (Mi Yang et al., 2022). FDX1 geni ürünleri Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)'dan aldığı elektronları

sitokrom p450'ye aktarır ve ayrıca redüktaz aktivitesi ile Cu^{+2} iyonlarını Cu^{+1} iyonlarına indirger (Tsvetkov et al., 2019; Mi Yang et al., 2022). FDX1 geni ürünü, mitokondri içinde bakırın elesklomolden salınımına aracılık eder (Zulkifli et al., 2023). Kuproptoz mekanizmasında FDX1 anahtar bir gendir (Tsvetkov et al., 2022). Cu^{+2} iyonlarını indirgemenin yanı sıra FDX1 gen ürünü DLAT proteininin lipoilasyonundan sorumludur ki bu olay bakır iyonlarının DLAT'a bağlanması ve proteo-toksisite sonucu hücre ölümü teşviki için gereklidir (Tsvetkov et al., 2022). Fakat kuproptoz mekanizmasını sunan araştırmacılar FDX1 gen ürününün DLAT lipoilasyonuna hangi yollar ile dahil olduğunu bildirmemiştir.

LIPT1

Lipoiltransferaz 1 (LIPT1) geni lipoik asidin proteinlere eklenme mekanizmasında (Lipoilasyon) görevli olan Lipoiltransferaz 1 proteinini kodlayan gendir (Habarou et al., 2017). Bu gen insanlarda 2. Kromozomda lokalizedir (National Center For Biotechnology Information, 2023). LIPT1 geninin kuproptoz mekanizması için önemli bir gen olduğunda dair kanıtlar mevcuttur (Tsvetkov et al., 2022).

LIAS

Lipoik asit sentetaz (LIAS) geni insanlarda 4. kromozomda bulunan ve lipoik asit sentetaz proteinini kodlayan gendir (National Center For Biotechnology Information, 2023). Mitokondride lokalize olan LIAS gen ürünü bir Fe-S küme proteinidir ve lipoik asit biyosentezinin son adımını katalizleme görevine sahip lipoik asit yolağı proteinidir (Hendricks, Wachnowsky, Fries, Fidai, & Cowan, 2021). Kuproptoz mekanizmasını sunan araştırmacılar FDX1 ve LIAS geninin silinmesi ile bakır aracılı hücre ölümünün azaldığına dair kanıtlar elde etmiştir (Tsvetkov et al., 2022). Buna göre LIAS kuproptoz mekanizması ile ilişkilendirilen önemli bir gen olarak ifade edilir.

DLD

Dihidrolipoil dehidrojenaz (DLD) geni insanlarda 7. kromozomda bulunur (National Center For Biotechnology Information, 2023). Bu gen glikoliz ile TCA döngüsünün keşişimi olan, pirüvatın asetil koenzim A'ya dönüşüm reaksiyonunu katalize eden PDH kompleksinde bulunan dihidrolipoil dehidrojenaz proteini kodlar (Duarte et al., 2021). Bu protein PDH kompleksinin E3 birimini temsil eder (Duarte et

al., 2021). DLD geninin kuproptoz mekanizması ile ilişkili bir gen olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Tsvetkov et al., 2022).

DLAT

Dihidrolipoamid S-asetiltransferaz (DLAT) geni insanlarda 7. Kromozomda bulunur ve pirüvat dehidrojenaz kompleksinin E2 bileşenini temsil eden proteini kodlar (Thelen et al., 1999) DLAT geni kuproptoz mekanizması için anahtar bir gendir (Tsvetkov et al., 2022). Kuproptozda DLAT'ın lipoik asit modifikasyonu oldukça önemlidir çünkü bakır iyonlarının DLAT'a bağlanması için DLAT lipoilasyonu gereklidir (Tsvetkov et al., 2022). Bakır aracılı hücre ölümünde meydana gelen proteo-toksisitenin oluşumu için lipoillenmiş DLAT'ın bakır teşvikli agregasyonu kuproptotik hücre ölümünde DLAT'ın önemini gözler önüne serer (Tsvetkov et al., 2022).

PDHA1

Piruvat dehidrojenaz E1 alt birim alfa 1 (PDHA1) geni insanlarda X kromozomunda bulunur (National Center For Biotechnology Information, 2023). Pirüvat dehidrojenaz kompleksinin E1 birimi (pirüvat dehidrojenaz) α ve β olmak üzere iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir (Lei et al., 2022). PDHA1 geni ise E1 alfa 1 alt birimini kodlayan gendir (Duarte et al., 2021). PDHA1 geninin kuproptoz ile ilişkili bir gen olduğu ifade edilmektedir (Tsvetkov et al., 2022).

PDHB

Piruvat dehidrojenaz E1 alt birim beta (PDHB) geni insanlarda 3. Kromozomda bulunur ve pirüvat dehidrojenaz E1 biriminin beta alt birimini kodlar (Brown et al., 2004). Kuproptoz mekanizmasını sunan araştırmacılar yaptıkları deneyler sonucunda PDHB geninin kuproptozla ilişkili olduğuna dair kanıtlar elde etmiştir (Tsvetkov et al., 2022).

SLC31A1

Çözünen taşıyıcı aile 31 üye 1 (SLC31A1) insanlarda 9. kromozomda bulunur ve 5 ekzondan oluşur (Wee et al., 2013). Bu genin ürünü olan SLC31A1 proteini bakır iyonlarının hücre içi ortama transferinden sorumlu bir transmembran proteinidir (Ge et al., 2022). Bakır aracılı hücre ölümünün elesklomolden bağımsız olarak fizyolojik koşullarda artan bakır birikimi ile de meydana gelip gelmeyeceğinin araştırılması

sonucu SLC31A1 geninin kuproptoz ile ilişkili bir gen olduğu anlaşılmıştır. Araştırmacılar insan embriyonik böbrek hücrelerinde SLC31A1 gen ifade düzeylerinin arttırılması ile kuproptotik ölüm arasındaki paralel ilişkiyi keşfetmiştir (Tsvetkov et al., 2022). Bu bulgular SLC31A1'in bakır aracılı hücre ölüm şeklinde rol oynayan bir gen olduğunu ispat eder niteliktedir.

ATP7B

ATPaz bakır taşıyan beta (ATP7B) geni bakır iyonlarının hepatositlerden ihracatını sağlayan ATP7B transmembran proteinini kodlar ve insanlarda 13. kromozomda bulunur (J. Chen et al., 2020). ATP7B genindeki mutasyonlar otozomal resesif bakır bağımlı kalıtsal bir hastalık olan Wilson hastalığının oluşumundan sorumludur (Ala et al., 2007). Kuproptoz mekanizmasını sunan araştırmacılar ATP7B geninin susturulması ile oluşturdukları Wilson farelerinde de artan hücre içi bakır konsantrasyonları ile birlikte elesklomolün teşvik ettiği hücre ölüm yolağına benzer şekilde hücre ölümlerinin meydana geldiği gözlemlemiştir (Tsvetkov et al., 2022). Buna göre ATP7B geni kuproptozu baskılan bir gen olarak kuproptoz ile ilişkilendirilebilir.

Kuproptoz yolağı ROS oluşumu dışında bakır toksisitesi için yeni bir fenomen olarak değerlendirilebilir. Kronik bakır maruziyetinin toksik bir sonucu olarak ROS birikiminin meydana geldiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır fakat kronik bakır maruziyeti ve kuproptoz yolağının ilişkilendirildiği herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine etkileri araştırılması amaçlanmıştır ve bu amaç doğrultusunda kuproptoz için anahtar gen olarak bildirilen FDX1 geni ve bakır iyonlarının hücreye alımı noktasında görevli transmembran proteini kodlayan SLC31A1 geni ifade düzeyleri ölçülmek üzere seçilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu Seçimi ve Serum Örneklerinin Eldesi

Kronik bakır maruziyetinin kuprotoz yolağı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmaya öncelikle en az 10 yıl süre ile bakır ağır metale maruz kalmış 26 gönüllü birey (Maruziyet Grubu) ve demografik özellikler açısından eşleştirilmiş, herhangi bir ağır metal maruziyet öyküsü bulunmayan 26 gönüllü birey (Kontrol Grubu) dahil edildi. Bireyler çalışmaya dahil edilirken aşağıda yer alan dahil edilme kriterleri göz önünde bulunduruldu:

Maruziyet Grubu;

- Kronik olarak bakır ağır metale maruz kalmış olmak (Bakır madeni, bakır işleme tesisi vb. çalışmış/çalışıyor olmak)
- 30-60 yaş aralığında olmak (Bakır madeninde çalışan/çalışmış işçi popülasyonu)
- Erkek olmak (Bakır madeninde çalışan/çalışmış işçi popülasyonu)
- Ağır metal maruziyeti başlamadan önce herhangi bir hastalık teşhisi almış olmamak

Kontrol grubu;

- 30-60 yaş aralığında olmak (Demografik özelliklerin örtüşmesi için)
- Erkek olmak (Demografik özelliklerin örtüşmesi için)
- Kronik olarak bakır ağır metale maruz kalmamış olmak (Bakır madeni, bakır işleme tesisi vb. çalışmış/çalışıyor olmamak)
- Herhangi bir hastalığı bulunmamak

Çalışma popülasyonunu oluşturacak kişi sayısı benzer çalışmalar dikkate alınarak %95 güven ($1-\alpha$), %95 test gücü ($1-\beta$), $d= 1.0202556$ etki büyüklüğü ile kontrol grubu da dahil minimum 52 olarak belirlendi.

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan toplam 52 gönüllü bireyden Çayeli Devlet Hastanesi Başhekimi izninde ve kontrolünde, etik kurul izinleri çerçevesinde Çayeli Devlet Hastanesi'nde 5 ml kan örneği alındı. Her bir gönüllü 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' imzası kapsamında kendi rızaları doğrultusunda çalışmaya dahil

oldu. Çalışmaya dahil edilen bireylerden demografik özelliklerini belirlemek adına gönüllü bilgi formu doldurulması istendi.

Alınan kan örnekleri 10 dk. 13.000 rpm’de santrifüj işlemine tabi tutularak serum örnekleri elde edildi. Elde edilen serum örnekleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına ulaştırılmadan önce yaklaşık 24 saat boyunca -20°C’ de ve iki kurum arası yolculuk mesafesi boyunca ise yaklaşık 5 saat boyunca buz bloklar yardımıyla +4°C’ de muhafaza edildi. Test laboratuvarına ulaştırılan serum örnekleri RNA izolasyonu adımı gerçekleştirilinceye kadar -80°C’de saklandı.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 14.12.2022 tarihli Etik Kurulunda incelenmiş ve amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem etik açıdan uygun bulunmuştur (Karar No: 2022/528) (Bkz: Ek 1).

3.2. Serum Örneklerinden RNA İzolasyonu

Serum örneklerinden total RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Kit protokolüne göre gerçekleştirilen RNA izolasyonu prosedüründe aşağıda yer alan adımlar takip edildi:

- -80°C’de muhafaza edilen serum örnekleri oda sıcaklığında çözdürüldü ve ardından 600 µl serum örneği 2 ml’lik eppendorf tüplerine transfer edildi.
- 600 µl serum örneğinin üzerine 700 µl QIAzol liziz reaktifi eklendi.
- Örnekler şırıngadan geçirilerek homojenize edildi ve işlem 10 kez tekrar edildi.
- Homojenize olan örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Örneklerin üzerine 140 µl kloroform eklendi ve kloroform eklenmiş örnekler 15 saniye boyunca manuel olarak hızlıca karıştırıldı.
- Örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
- Örnekler 13.000 rpm’de, 4°C’de 15 dakika santrifüj uygulandı.
- Santrifüj işleminin ardında oluşan üst faz 2 ml’lik yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Örneklerin üzerine 1,5 hacimde %100 etanol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Örnekler kit içerisinde bulunan RNeasy Mini spin kolonlarına aktarıldı.

- Örneklere 10.000 rpm’de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj uygulandı.
- Kolonun toplama tüpüne geçen sıvı (flow through) atıldı ve toplama tüpü tekrar kolona geçirildi.
- Kolonda bulunan örneklerin üzerine 700 µl RWT Tamponu eklendi.
- Örneklere 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj uygulandı.
- Kolonun toplama tüpüne geçen sıvı (flow through) atıldı ve toplama tüpü tekrar kolona geçirildi.
- Kolonda bulunan örneklerin üzerine 500 µl RPE Tamponu eklendi.
- Örneklere 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj uygulandı.
- Kolonun toplama tüpüne geçen sıvı (flow through) atıldı ve toplama tüpü tekrar kolona geçirildi.
- Kolonda bulunan örneklerin üzerine bir kez daha 500 µl RPE Tamponu eklendi.
- Örneklere 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj uygulandı.
- Toplama tüpleri tüplerine geçen sıvı (flow through) ile beraber atıldı.
- Örneklerin bulunduğu RNeasy Mini spin kolonları yeni toplama tüplerine eklendi.
- Örneklere 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj uygulandı.
- Örneklere 30 µl RNaz bulunmayan su eklendi (RNaz Free Water).
- Örneklere 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüj uygulandı.
- Örnekler yoğunlaştırıldı (Toplama tüpünde kalan sıvı tekrar kolonun membranına eklendi).
- Örneklere 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüj uygulandı.
- Toplama tüplerinde ve RNA’ların bulunduğu sıvı eppendorf tüpüne alındı ve cDNA eldesine kadar -2°C’de muhafaza edildi.

RNA izolasyonu ve cDNA eldesi adımları arasında maksimum 24 saat bulunmaktadır.

3.3. RNA Örneklerinden cDNA Eldesi ve Kalite Ölçümü

Elde edilen RNA örneklerinden “ABM Good 5X All-In-One RT MasterMix” kiti kullanılarak ters transkripsiyon yöntemi ile komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre takip edilen adımlar aşağıdaki gibidir:

- RNA örneklerine 7.000 rpm’de 2-3 saniye santrifüj uygulandı.

- İçerisinde EasyScript™ Revers Transkriptaz (Ters Transkriptaz), RNaseOFF Ribonükleaz İnhibitörü, RNaz İçermeyen Ribonükleaz İnhibitörü, dNTP'ler, Oligo(dT)'ler ve rastgele primerler içeren “ 5X All-In-One RT MasterMix ” karışımına 7.000 rpm'de 2-3 saniye santrifüj uygulandı.
- “5X All-In-One RT MasterMix” karışımından 2 µl miktarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüplerine aktarıldı.
- “5X All-In-One RT MasterMix” karışımı bulunan her bir PCR tüpüne uygun numarasında göre 8µl RNA rneđi eklendi ve toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı.
- Örneklere 7.000 rpm'de 2-3 saniye santrifüj uygulandı.
- Örnekler ters transkripsiyon koşullarına tabi tutuldu ve bu işlem için GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, foster City, CA) cihazı kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Revers transkripsiyon reaksiyonu koşulları

Revers Transkripsiyon Reaksiyon Koşulları	
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
25°C	10 dk
42°C	15 dk
85°C	5 dk
4°C	1 dk

Elde edilen cDNA'ların kalite ve miktar ölçümleri için spektrofotometre (Multiscan GO, Thermo Scientific, USA) cihazı kullanıldı. Ölçümlerin ardından cDNA örnekleri qPCR reaksiyonları için 1/6 oranında seyreltildi. Örnekler qPCR adımına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.4. Real-Time PCR Analizleri

En az on yıl süre ile bakır ağır metaline maruz kalmış ve çalışmanın maruziyet grubunu oluşturan 26 birey ve herhangi bir maruziyet geçmişi bulunmayan ve çalışmanın kontrol grubunu oluşturan 26 bireyin serumlarında kuproptoz ile ilişkili

FDX1 ve SLC31A1 genlerinin ve ayrıca Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) geninin ifade düzeyleri Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazı kullanılarak Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) (qPCR) analizleri ile gerçekleştirildi. Real-Time PCR uygulamaları PCR reaksiyonu devam ederken sentezlenen DNA miktarının aynı anda bir monitör yardımı ile izlenmesini sağlar. Bu teknikte genelde oluşan DNA miktarının saptanması adına floresan işaretli problemler veya boyalar kullanılır (GÜNEL & AYDINLI, 2009). SYBR Green I boyası bu amaç doğrultusunda sık kullanılan floresan boyalardan biridir (Giglio, Monis, & Saint, 2003). Sentezlenen DNA miktarı arttıkça monitörde gözlenen floresan ışımaya artar. Rastgele oluşan floresan ışımaya aşılması noktası ise hedef ürünün bu eşik değeri aşmak için kaç döngü sayısı verdiğini ifade eder ve bu değer ürünün Ct (threshold cycle) değerini temsil eder (Schmittgen & Livak, 2008). Bu teknik sayesinde hedef nükleik asit miktarı veya hedef genlerin ifade düzeyleri tespit edilebilir (Fraga, Meulia, & Fenster, 2008).

İfade düzeyleri belirlenmek istenen genler FDX1 ve SLC31A1 için qPCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere spesifik primerler seçildi (Tablo 3.2). Primer seçiminde literatürde gerçekleştirilmiş araştırmalarda kullanılan ve güvenilir sonuçlar elde edilmiş primerler tercih edildi. qPCR’da hedef genlerin ifade düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla kontrol gen olarak GAPDH geni seçildi ve GAPDH için literatürde yapılan çalışmalarda güvenilirliği ispatlanmış gene özgü primerler seçildi (Tablo 3.2). GAPDH geni ATP üretimi için glikoliz yolağında rol oynar ve “Housekeeping” gen olarak isimlendirilir ve genin ifade düzeyleri farklı dokularda veya organizmalarda değişiklik göstermeden sabit kalır (Barber, Harmer, Coleman, & Clark, 2005; Nicholls, Li, & Liu, 2012). Bu özelliklerinden ötürü GAPDH geni belirlenen genlerin ifade düzeylerini tespit etme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir kontrol genidir (Barber et al., 2005).

Tablo 3.2. İfade düzeyleri belirlenen genlerin primerleri

Primerler			
Genler	Forward Primer (İleri Primer) 5'→3'	Revers Primer (Geri Primer) 5'→3'	Referanslar
FDX1	TTTGGTGCATGTGAGGGAA	GGCATCAGCCACTGTTTCA	(Pan et al., 2022)
SLC31A1	TGACCTTCTACTTTGGCTTTA	GCTGACTTGTGACTTACGC	(Pan et al., 2022)
GAPDH	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG	CGCCCCACTTGATTTTGGAG	(Dahn, Dean, Jo, Coyle, & Marcato, 2021)

qPCR analizleri için RT-SYBR Green qPCR kiti kullanıldı. Tablo 3.3'te verilen qPCR karışımı kit protokolüne göre hazırlandı ve ardından karışıma 7000 rpm'de 1-2 saniye santrifüj uygulandı. qPCR reaksiyon koşulları Tablo 3.4'de gösterildiği üzere uygulandı.

Tablo 3.3. qPCR reaksiyonu bileşenleri

qPCR Reaksiyonu Bileşenleri	
	Hacim (µl)
Bright Green qPCR Master Mix	5 µl
Gene özgü ileri primer (Forward primer)	0,3 µl
Gene özgü geri primer (Revers primer)	0,3 µl
Nükleaz içermeyen saf su	3,4 µl
cDNA	1 µl
Toplam Hacim:	10 µl

Tablo 3.4. qPCR reaksiyon koşulları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Enzim Aktivasyonu	95°C	10 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Uzama	60°C	60 saniye	

3.5. İstatistiksel Analiz

FDX1 ve SLC31A1 genlerinin ifade düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla $2^{-\Delta Ct}$ formülü uygulandı. Buna göre qPCR reaksiyonu sonucu elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri ile referans gen olan GAPDH geninin Ct değeri arasındaki farkın alınması ile değerler normalleştirildi ve bu değerler formülde ifade edilen ΔCt değerini verdi. Burada ifade edilen Ct değerleri numunelerin eşik değeri geçmesi için gerekli olan döngü sayısını ifade eder ve eşik değeri geçmek üzere daha az döngü sayısına ihtiyaç duyan numunenin ifade düzeyi daha yüksek olarak değerlendirilir. Formül sonucu elde edilen değerler bakıra maruz kalan bireyler ve kontrol grubu arasında, bahsi geçen genlerin ifade düzeylerinin istatistiki analizlerinin yapılması amacıyla ve gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak demografik özellikler açısından karşılaştırılması amacıyla kullanıldı.

Formül 3.1. $2^{-\Delta Ct}$ Formülü

$$2^{-\Delta Ct} (\text{Hedef gen Ct değeri} - \text{Referans gen Ct değeri})$$

İstatistiki analizler SPSS 21 (IBM software, Pointe Claire, Quebec, Kanada) programı ile gerçekleştirildi. Örnek sayısı 30'un üzerinde olduğundan ötürü normallik testlerinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Örnekler normal dağılım göstermediğinden ötürü parametrik olmayan testler kullanıldı ve iki bağımsız grup

ortalama karşılaştırma testlerinde Mann-Whitney U testi uygulandı çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testi uygulandı. Korelasyon analizlerinde ise örnekler normal dağılıma sahip olmadığından ötürü Spearman testi uygulandı. Tüm istatistiksel analizler $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde ve %95 güven aralığında değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Gönüllü Popülasyonu

Katılımcıların 26'sı bakır ağır metale kronik olarak maruz kaldığı düşünülen maruziyet grubunu oluşturdu ve bu bireyler bir bakır madeninde en az 10 yıl süre ile çalışan veya çalışmış bireyleri kapsadı. Bakır madeninde bulunan yer altı ve yer üstü maden çalışma koşulları dikkate alındığında çalışmaya dahil edilen 26 bireyin de bakır madeni yer altı koşullarında çalışma geçmişi olduğu görüldü. Bununla beraber sadece yer altı koşullarında çalışan bireyler çalışma grubunun %65,38'ini oluşturdu. Bireylerin demografik özelliklerine Tablo 4.5'de yer verildi.

Tablo 4.5. Demografik özellikler

Demografik Özellikler	Çalışma Grupları	
	Maruziyet Grubu	Kontrol Grubu
Kişi Sayısı (n)	n =26	n = 26
Yaş Ortalaması	44,15 ± 5,55	44,80 ± 8,37
Sigara Kullanımı	%53,84	%50
Alkol Kullanımı	%0	%3,84
Ortalama Maruz Kalma Süresi (Yıl)	15,37 ± 3,34	-
Çalışma Durumu	Aktif Çalışan	%57,69
	Aktif Çalışmayan	%42,30

Ortalama ± Standart Sapma

4.2. cDNA Ölçüm Sonuçları

cDNA kalite ölçümlerinde A260/A280 değerleri dikkate alındı ve kaliteli olarak nitelendirilecek cDNA A260/A280 değerinin 1,8 olması beklendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. cDNA konsantrasyon ve kalite ölçüm sonuçları

Örnek Numarası	Çalışma Grupları			
	Maruziyet Grubu		Kontrol Grubu	
	Konsantrasyon ($\mu\text{m}/\text{ml}$)	A260/A280	Konsantrasyon ($\mu\text{m}/\text{ml}$)	A260/A280
1	1293	1,680	2470	1,741
2	1236	1,684	1525	1,797
3	2672	1,710	1559	1,705
4	899,7	1,683	1741	1,692
5	2027	1,786	1378	1,703
6	1764	1,694	1269	1,705
7	2150	1,645	1365	1,677
8	1807	1,785	1763	1,778
9	1630	1,799	1335	1,794
10	1619	1,695	1434	1,664
11	1658	1,696	1345	1,779
12	2001	1,688	2042	1,662
13	2152	1,683	1684	1,773
14	1513	1,697	1358	1,765
15	1518	1,795	1469	1,700
16	1468	1,706	1589	1,786
17	1632	1,703	1319	1,697
18	1779	1,794	1237	1,774
19	1710	1,696	1871	1,781
20	1476	1,706	1549	1,778
21	1512	1,701	1498	1,682

22	1420	1,704	1476	1,694
23	2224	1,672	1417	1,776
24	1261	1,666	1604	1,672
25	1269	1,684	1216	1,700
26	1279	1,708	1578	1,682

4.3. Gen İfade Düzeyleri Sonuçları

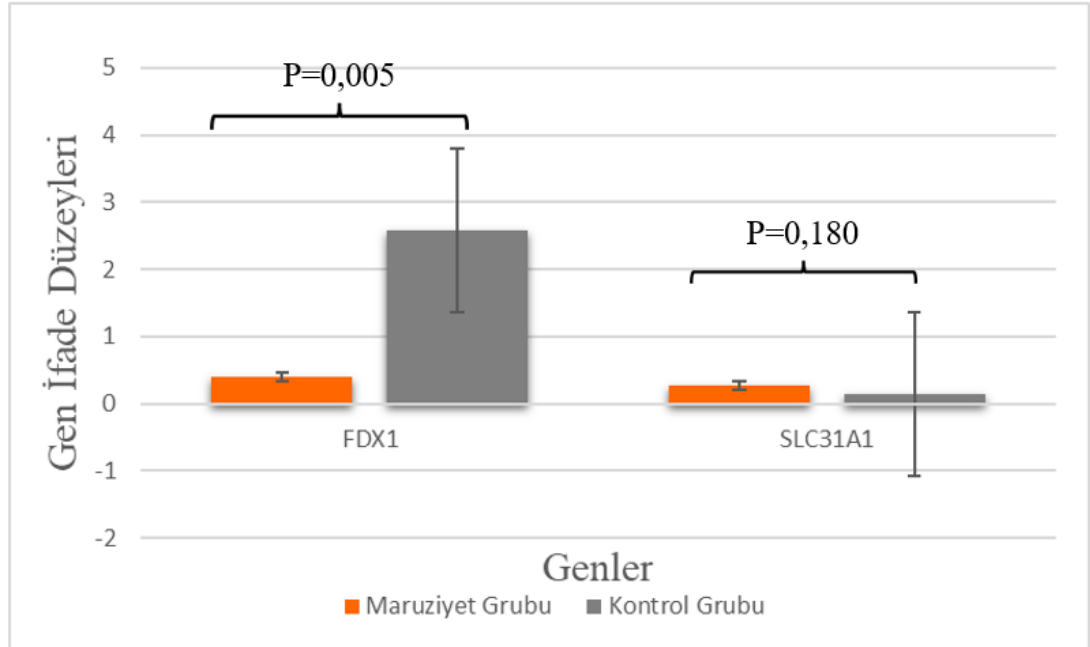
FDX1, SLC31A1 ve GAPDH genlerinin ifade analizlerinden elde edilen Ct değerleri Tablo 4.7’de yer almaktadır.

Tablo 4.7. qPCR sonucu elde edilen Ct değerleri

Örnek Numarası	FDX1 Ct Değerleri		SLC31A1 Ct Değerleri		GAPDH Ct Değerleri	
	Maruziyet Grubu	Kontrol Grubu	Maruziyet Grubu	Kontrol Grubu	Maruziyet Grubu	Kontrol Grubu
1	30,22	37,29	45,63	29,57	27,82	26,41
2	29,72	28,82	30,86	28,65	26,55	24,44
3	31,79	29,82	43,96	32,52	29,21	26,08
4	29,40	27,65	28,75	31,05	27,60	24,88
5	30,32	30,61	28,77	29,11	25,78	25,01
6	28,64	46,51	28,31	28,65	26,95	24,96
7	30,92	37,76	28,29	32,66	27,17	27,34
8	31,97	36,00	32,12	31,56	27,76	28,88
9	30,00	25,02	31,28	35,18	25,80	29,10
10	28,05	45,77	30,52	44,11	26,33	27,95
11	27,57	35,09	31,36	30,99	27,16	30,30
12	27,62	43,98	28,30	45,30	25,84	28,08
13	27,53	31,50	29,10	29,89	27,90	36,02
14	28,25	31,76	29,57	30,80	27,93	29,35
15	37,16	31,25	44,72	38,00	29,80	28,80

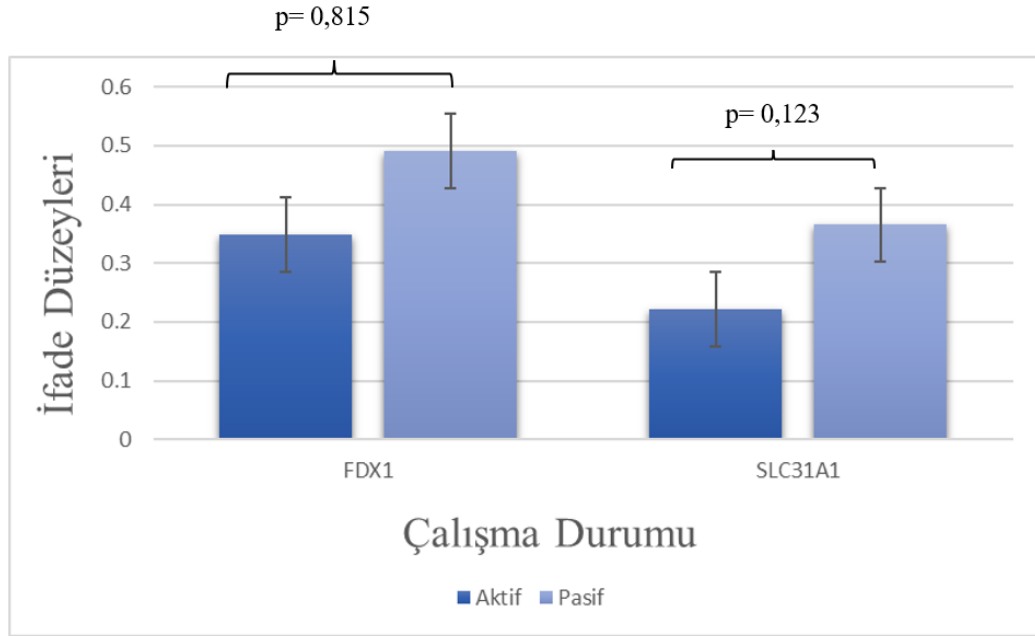
16	27,77	33,86	27,70	31,59	28,32	29,62
17	32,78	38,74	29,69	31,19	26,52	26,33
18	28,99	29,65	28,33	44,14	28,66	27,19
19	31,19	47,94	26,63	31,98	25,55	29,68
20	26,34	20,49	30,46	30,21	25,90	27,45
21	36,25	20,39	31,17	30,81	29,61	28,08
22	23,50	39,54	30,77	30,06	28,62	28,31
23	26,03	44,71	28,96	30,36	26,00	28,73
24	30,63	22,58	30,72	30,36	28,05	26,77
25	28,65	29,09	21,58	29,01	28,61	26,08
26	29,26	28,93	30,42	28,51	27,28	27,26

Yapılan istatistiksel analizlerin sonucunda maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla FDX1 ifade düzeylerinin anlamlı düzeyde ($p<0,05$) azaldığı görüldü. SLC31A1 ifade düzeylerinin ise maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığı görüldü fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.11).



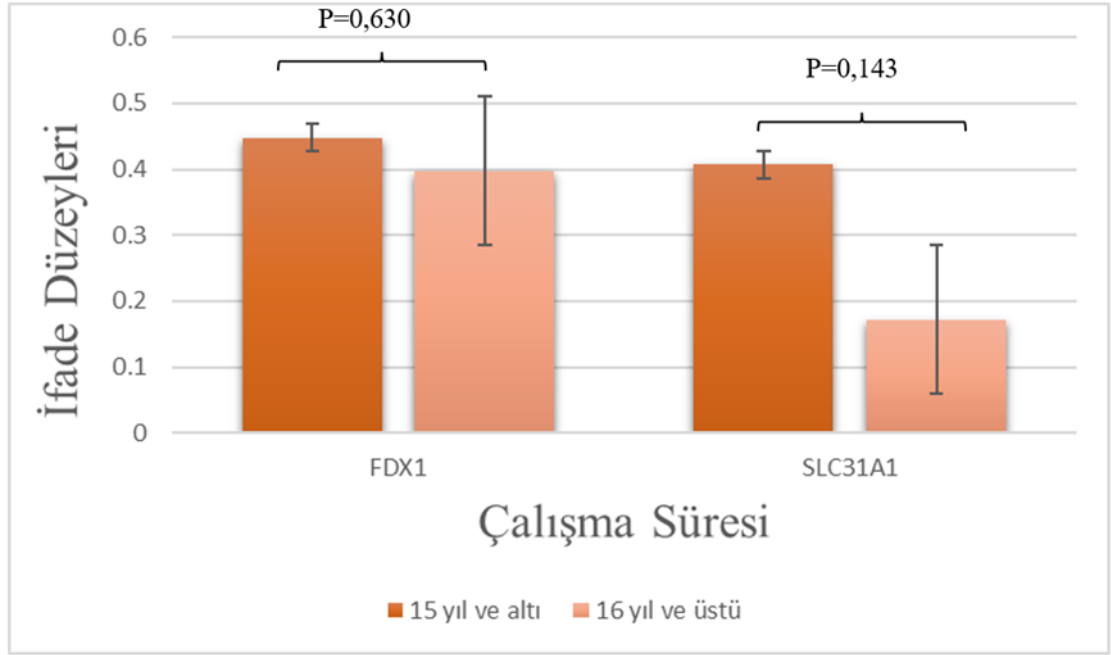
Şekil 4.11. FDX1 ve SLC31A1 genlerinin ifade düzeylerinin maruziyet ve kontrol grubu arasında kıyaslanması

Çalışmanın maruziyet grubunu oluşturan bireyler bakır madeninde çalışmış ve hali hazırda çalışan bireyleri kapsamaktadır. FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin aktif olarak çalışan bireyler ve önceden çalışmış bireyler arasında karşılaştırmaları yapıldı ve aktif olarak çalışan bireylerde hem FDX1 hem de SLC31A1 ifade düzeyleri çalışmayan bireylere kıyasla düşük bulundu fakat her iki değer de istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.12).



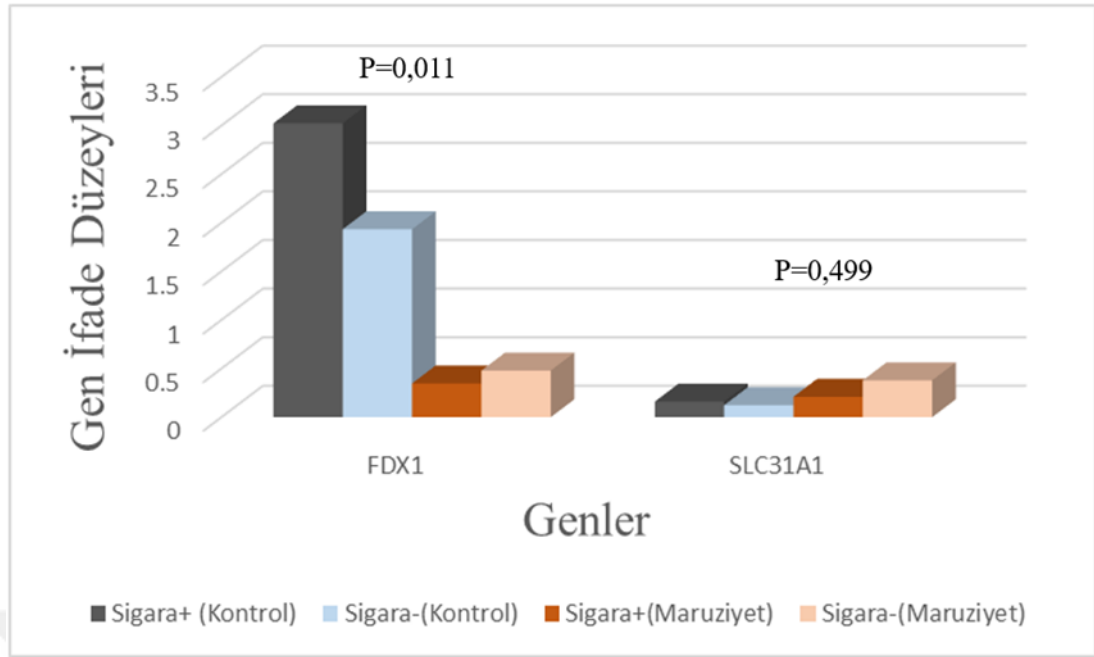
Şekil 4.12. Bakır madeninde aktif çalışan bireyler ve önceden çalışmış bireyler arasında FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Bakır madeninde çalışmış/çalışan bireylerin çalışma süreleri açısından FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeyleri değerlendirildi ve gen ifade düzeyleri 15 yıl ve altı çalışma süresine sahip bireylerde 16 yıl ve üstü çalışma süresine sahip bireylere kıyasla düşük bulundu fakat bu fark istatistiksel anlamlılık ifade etmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Bakır madeninde çalışmış/çalışan bireylerin çalışma süresi açısından FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin karşılaştırılması

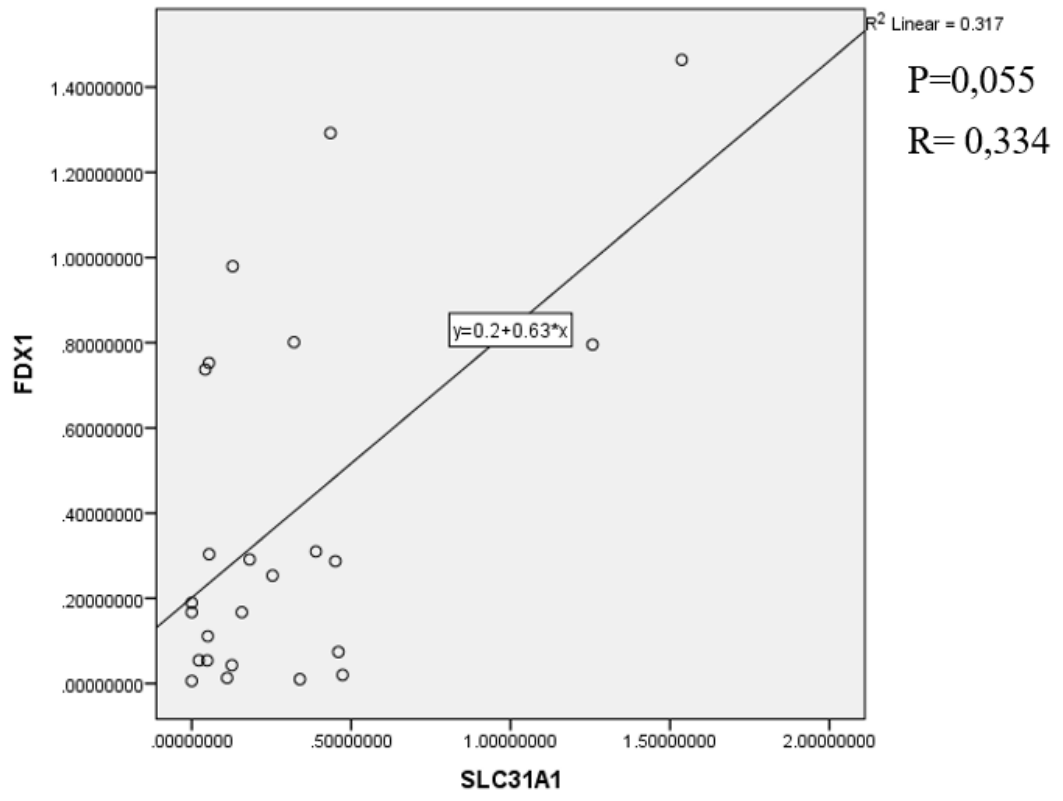
Gruplar arasında sigara içme durumları açısından karşılaştırmalar yapıldı. Buna göre bireyler kontrol grubunda sigara içenler (Sigara+(Kontrol)), kontrol grubunda sigara içmeyenler (Sigara-(Kontrol)), maruziyet grubunda sigara içenler (Sigara+(Maruziyet)) ve maruziyet grubunda sigara içmeyenler (Sigara-(Maruziyet)) şeklinde 4 farklı gruba ayrıldı. Gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda FDX1 geni için anlamlı düzeyde farklılıklar saptandı ($p<0,05$). Diğer bir taraftan SLC31A1 geni için gruplar arasında anlamlı farklılıklara rastlanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Sigara içme ve bakır maruziyetinin FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeyleri üzerine etkisi

SLC31A1 ve FDX1 arasındaki ilişki araştırıldı. 52 örnek arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda SLC31A1 ve FDX1 arasında pozitif yönde düşük korelasyon saptandı ($r=0,178$) fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Yalnızca kontrol grubunda FDX1 ve SLC31A1 ilişkisine bakıldığında ise iki gen arasında korelasyon bulunamadı ($r=0,004$). Maruziyet grubunda yapılan korelasyon analizleri sonucunda ise FDX1 ve SLC31A1 arasında orta düzeyde pozitif korelasyon saptandı ($r=0,334$) ve bu değer anlamlılık değerine oldukça yakındı ($p=0,055$) (Şekil 4.15).

Tüm grupların dâhil edilmesi ile (maruziyet grubu, kontrol grubu) 52 örnekte gen ifade düzeyleri ve yaş arasındaki korelasyon değerlendirildi ve FDX1 ifade düzeyi ve yaş arasında negatif yönde zayıf korelasyon saptandı ($r=-0,081$) fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). SLC31A1 ve yaş arasında negatif yönde zayıf korelasyon saptandı ($r=-0,202$) fakat bu değer de istatistiksel anlamlılık ifade etmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.15. Maruziyet grubunda FDX1 ve SLC31A1 gen ifade düzeylerinin korelasyonu

5. TARTIŞMA

Organizmalar yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek adına bazı eser elementlere ihtiyaç duyar. Bakır hücre içerisinde çeşitli yolaklarda roller üstlenerek organizmalar için vazgeçilmez olan bu elementlere örnektir. Hücre içerisinde gerçekleşen metabolik süreçlere dahil olan bakır için bu bağlamda enzim kofaktörü olarak roller üstlenmesi öne çıkar. Sinyal iletim süreçleri ve biyomolekül sentezi gibi süreçlere de dahil olan bakır, antioksidan savunmadan nörotransmitter sentezine kadar birçok metabolik süreçte önemli roller üstlenir (Tsang et al., 2021). Diğer bir taraftan bakır Cu^{+2} ve Cu^{+1} oksidasyon durumları arasında redoks reaksiyonları ile değişim gerçekleştirir ve bu özellik bakırın toksik bir element olarak değerlendirilmesi noktasında öne çıkmaktadır (Tsang et al., 2021).

Hücre içerisinde değişen bakır konsantrasyonları çeşitli olumsuz sonuçlarla eşleştirilmiştir. Bakırın redoks reaksiyonları aracılığıyla ROS üreterek oksidatif strese ve biyomolekül hasarına sebep olabilmesi buna örnektir (Cervantes-Cervantes et al., 2005). Hücre içerisinde protein sistemlerince dengede tutulan bakır konsantrasyonları bu anlamda oldukça önemlidir (La Fontaine & Mercer, 2007). Bunun yanı sıra gıdalar, içme suları ve çevresel faktörler vasıtasıyla bakır ağır metale maruz kalmak hücre içi bakır konsantrasyonlarını bozarak istenmeyen sonuçlar doğurur (Gaetke et al., 2014). Bakır maruziyet vakaları daha çok bakır endüstrisinde çalışan bireylerde meydana gelir (Dorsey & Ingeman, 2004). Uzun yıllar mesleki alanlarda bakır ağır metale maruz kalmak, maruz kalan bireylerde oksidatif stres belirteçlerinde artışına sebep olurken aynı zamanda DNA hasarını arttırır ve bu bakırın ROS üretme kabiliyeti ile eşleşir (Da, 2019; De Olivera et al., 2012; Palus et al., 2005). Bakır maruziyetinin toksik bir sonucu olarak düşünülen ROS üretiminin yanı sıra hücrede artan bakır konsantrasyonları hücreyi ölüme sevk ederek toksisite sergileyebilir. Hücre içi artan bakır konsantrasyonu aracılı hücre ölüm yolağı bu noktada bakır toksisitesi için yeni bir aday olarak düşünülebilir (Tang et al., 2022).

Bu çalışmada bakır kaynaklı hücre ölüm yolağı olan kuproptozun kronik bakır maruziyetine yanıt olarak devreye girme potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda ortalama 15 yıl bir bakır madeninde çalışmış veya halihazırda çalışan 26 bireyin ve herhangi bir ağır metal maruziyet geçmişi bulunmayan 26 bireyin serumlarında kuproptoz ile ilişki genler FDX1 ve SLC31A1'in qPCR ile ifade analizleri gerçekleştirildi.

qPCR sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla bakıra maruz kalan bireylerin serumlarında kuproptoz için anahtar gen olarak nitelendirilen FDX1 geni ifade düzeyleri anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p<0,05$). Diğer bir taraftan bakır iyonlarının hücreye girişi noktasında görevli ve kuproptoz ile ilişkili SLC31A1 gen ifade düzeyleri bakıra maruz kalan bireylerde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ifade düzeylerine sahipti fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$).

İnsanlar üzerinde benzer amaçlarla gerçekleştirilen bir çalışma bulunmamakla birlikte kronik bakır maruziyetinin tavuk karaciğerinde kuproptoz üzerine etkilerinin değerlendirildiği Zhong ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada tavuklara diyetle verilen bakır miktarları ile paralel olarak (11 mg/Kg, 110 mg/kg, 220 mg/kg, 330 mg/kg) tavuk karaciğerinde ve serumda MDA seviyelerinin arttığı ve bakır maruziyetinin tavuklarda hepatotoksisiteye sebep olduğu bildirildi. Bakır kaynaklı hepatotoksisitenin kuproptoz mekanizması ile ilişkisine bakıldığında ise 220 mg/kg ve 330 mg/kg dozlarda bakır ile muamele edilen grupların serum FDX1 gen ifade düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı bildirildi. Ardından 330 mg/kg bakır ile muamele edilen grupta lipoillenmiş DLAT seviyelerinin ve lipoillenmiş DLAT agregasyonunun arttığı görüldü ve bu sonuçlar tavuk karaciğerinde bakır maruziyeti kaynaklı toksisitenin kuproptoz ile eşleşme olasılığını destekledi (Zhong et al., 2023). Zhang ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada ise erkek fareler üzerinde, mesleki maruziyetten sonra insanlarda bakıra maruz kalma noktasında en öne çıkan yol olan içme suyu maruziyeti modeli oluşturuldu. Çalışmanın sonuçlarına göre içme suyu yoluyla bakıra maruz kalan farelerde beyin hasarı meydana geldi ve oksidatif hasar indüklendi. Kuproptoz ile ilişkili parametrelere bakıldığında ise FDX1 protein seviyelerinin bakır miktarı ile paralel olarak azaldığı, DLAT protein seviyelerinin arttığı görüldü. SLC31A1 protein ifadelerinin ise hücre içi bakır transferini kolaylaştırmak için arttığı bildirildi. Bu sonuçlara göre artan bakır muamelesi ile azalan FDX1 protein seviyeleri FDX1'in bir Fe-S küme proteini olduğu ve kuproptoz mekanizmasında Fe-S küme proteinleri kaybının meydana geldiği düşünüldüğünde, farelerde bakır maruziyetinin kuproptozu teşvik edebileceği ihtimali öne çıkar (Y. Zhang et al., 2023). Benzer çalışmalardan elde edilen bulguların paralelinde sonuçlar elde edilmediğinden ötürü bulgular literatürü destekler nitelikte değildi. Diğer bir taraftan Li ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada uzun süreli bakır maruziyetinin domuz testisinde SLC31A1 mRNA ifade düzeylerini arttırdığı

bildirildi (Yuanliang Li et al., 2021). Bu, çalışmamızda anlamlı ölçüde olmasa da bakıra maruz kalan bireylerde kontrol grubuna kıyasla artan SLC31A1 gen ifade düzeyi sonuçları ile paraleldi. Craig ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada Zebra balığında su kaynaklı bakır maruziyeti sonucu balıkların solungaçlarında ve bağırsaklarında SLC31A1 ve DMT1'i kodlayan genin (SLC11A2) ifade düzeylerinin kontrole kıyasla arttığı görüldü (Craig, Galus, Wood, & McClelland, 2009). Bu da SLC31A1 özelinde çalışma sonuçları ile paraleldi.

Hücre dışı bakır miktarının artması ile birlikte aşırı bakır alımını önlemek için SLC31A1'in veziküller endositozu meydana gelirken, hücre dışı bakır miktarındaki azalma ile birlikte plazma zarındaki SLC31A1 seviyelerinin eski haline geldiği bildirilmiştir (Curnock & Cullen, 2020; Lutsenko, 2010). Bu bilgi ışığında bakır maruziyeti sonucu SLC31A1 proteininin hücre içine bakır iyonlarının alımını azaltarak bakır homeostaz mekanizmasını devreye soktuğu ve kuproptoz teşvikine engel olduğunu düşünülebilir. Craig ve arkadaşlarının zebra balıkları üzerinde yaptığı çalışmada da bu fikri destekler nitelikte sonuçlar vardır. Zebra balığında bakır maruziyeti ile birlikte SLC31A1 protein ifadesinde azalmaların yanı sıra SLC31A1'in hücre içi bakır alımının da azaldığı görülmüştür (Craig et al., 2009). Her ne kadar bu sonuçlar SLC31A1 ifade düzeyleri için çalışmamızla paralel sonuçlar verse de bulguların desteklenmesi adına insanlar özelinde çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Diğer bir taraftan bakır madeninde aktif çalışan bireyler ve önceden çalışmış bireyler arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin aktif çalışan bireylere kıyasla hali hazırda madende çalışmayan bireylerde yüksek olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Ayrıca bahsi geçen genler bakır madeninde çalışma süreleri açısından değerlendirildiğinde ise çalışma süresi arttıkça (bakıra maruz kalma süresi) FDX1 ve SLC31A1 gen ifadelerinin azaldığı görüldü fakat bu değerler de istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmedi ($p>0,05$). Sonuçlar her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna kıyasla maruziyet grubunda artan SLC31A1 ifade düzeyleri ile maruziyet grubunda bakır maruziyet süresi arttıkça azalan SLC31A1 ifade düzeyleri sonuçları tutarlılık ifade etmemektedir. Bu bulguların değerlendirilebileceği benzer çalışmalara bakıldığında DA ve arkadaşları tarafında 2019 yılında yapılan çalışmada bakır işleme fabrikasında çalışan bireylerde kontrol grubuna kıyasla

lökositlerde DNA hasarının ve oksidatif stres belirteçlerinin anlamlı düzeyde arttığı ifade edildi ve çalışma süresi, yaş ve sigara içme parametrelerinin DNA hasarı ile anlamlı ilişki sergilemediği belirtildi (Da, 2019). De Olivera ve arkadaşları tarafında yapılan benzer bir çalışmada da bakır izabe tesisi çalışanlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artan DNA hasarı bildirildi fakat maruz kalma süresi ve yaş parametrelerinin DNA hasarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı ifade edildi (De Olivera et al., 2012). Bu çalışmada maruziyet grubunda sigara içme durumu açısından yapılan değerlendirmelerde sigara içen bireylerde FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinin içmeyen bireylere kıyasla yüksek olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bir değer olmadığı görüldü. Bu bulgular literatür ile paralel sonuçlar verdi.

Kontrol grubunda sigara içme ile FDX ve SLC31A1 ifade düzeyleri karşılaştırıldı ve SLC31A1 için anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$) FDX1 ifade düzeyleri sigara içen bireylerde sigara içmeyenlere kıyasla anlamlı ölçüde arttı ($p<0,05$). FDX1 ifade düzeylerinin en yüksek olduğu grup kontrol grubunda yer alan sigara içen bireylerdi, en düşük ifade düzeyi ise maruziyet grubunda yer alan sigara içen bireylere aitti. Tütün dumanı akciğer kanserinin başlaması ve gelişmesi noktasında önemli bir ajandır (Lu et al., 2020). FDX1 ve SLC31A1 genleri akciğer kanseri için prognostik belirteç olabilecek kuproptoz ile ilişkili genlerden ikisidir (Y. Liu et al., 2022). FDX1 özelinde kontrol grubunda sigara içen bireylerde artan gen ifade düzeylerini akciğer kanseri üzerinden yorumlamak mümkün olsa da kanserin heterojen doğası gereği bu gerçekçi bir değerlendirme ifade etmez (Z. Chen, Fillmore, Hammerman, Kim, & Wong, 2014). Diğer bir taraftan bakır izabe tesisi ve bakır madeni çalışanlarında akciğer kanseri riskinin artırdığı bildirilmiştir (R. Chen et al., 1993; Kuratsune et al., 1974). Bu bilgi ışığında bulgular yüzeysel bir yaklaşımla değerlendirmeye alındığında ise hem maruziyet grubunda sigara içen bireylerde içmeyenlere kıyasla azalan FDX1 ifade düzeyleri hem de genel tabloda maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla azalan FDX1 ifade düzeyleri bu yaklaşımı desteklemez.

Tsvetkov ve arkadaşları kuproptoz için anahtar gen FDX1'in yanı sıra SLC31A1'inde kuproptoz ile ilişki olduğu ifade etti. Araştırmacılar insan embriyonik böbrek hücrelerinde SLC31A1 ifade düzeylerini arttırdıklarında hücrelerde kuproptotik ölümün meydana geldiğini gördü (Tsvetkov et al., 2022). Dolayısıyla

bakır iyonlarının hücre içerisine transferini sağlayan SLC31A1 proteinlerinin hücre içi bakır konsantrasyonlarını arttırarak hücreleri kuproptoza karşı duyarlı hale getirdiği söylenebilir (Tang et al., 2022). Bu ifadelere göre FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeyleri arasında pozitif bir ilişki olduğu anlaşılır (Tsvetkov et al., 2022). Çalışmaya dahil edilen grupları ayırmaksızın SLC31A1 ve FDX1 ifade düzeyleri arasındaki korelasyon araştırıldı ve genler arasında düşük seviyede pozitif ($r=0,178$) bir korelasyon bulundu fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Yalnızca maruziyet grubunda yapılan korelasyon analizi sonucunda ise FDX1 ve SLC31A1 genleri arasında orta düzeyde pozitif bir korelasyon ($r=0,334$) olduğu görüldü ve bu değer anlamlılık değerine oldukça yakındı ($p=0,055$). Diğer bir taraftan yalnızca kontrol grubunda yapılan korelasyon analizinde FDX1 ve SLC31A1 genleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmadı ($r=0,004$). Bu sonuçlardan yalnızca maruziyet grubunda yapılan FDX1 ve SLC31A1 korelasyon analizi değerlerinin literatürü destekler nitelikte olduğu görüldü. Buna göre gen ifade düzeylerindeki artışın iki genin kuproptozdaki rolü ile ilişkili olarak birlikte artma ihtimalinin olası olduğu değerlendirilebilir.

Bakır her ne kadar yaşam için gerekli bir element olsa da kronik bakır maruziyetinin toksik sonuçlar doğurduğu ispatlanmıştır. Bu çalışmanın dizaynına benzer şekilde bakıra maruz kalma ihtimali yüksek olan bireylerin dahil edildiği çalışmalarda bakır maruziyetinin toksik bir sonucu olarak artan DNA hasarları ve oksidatif stres artışı bildirilmiştir (Kumar et al., 2016; Shahrokhi et al., 2021). Bu çalışmalar ROS üretme kabiliyetinin kronik bakır maruziyetinin toksik sonucu olduğunu ispat eder. Bu çalışmada ise bakıra maruz kalma ihtimalinin yüksek olduğu bakır madeni çalışanlarında kuproptoz ile ilgili genler FDX1 ve SLC31A1'in ifade düzeyleri araştırılarak bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine etkileri ve dolayısıyla kuproptozun bakır maruziyeti için yeni bir toksisite mekanizması olma potansiyeli değerlendirildi. Bu çalışma bu kapsamda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışma sonucunda çalışma dizaynına uygun olmayan sonuçlar elde edildi. Buna göre kronik olarak bakıra maruz kalan bireylerde kuproptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinin kontrol grubuna göre artış göstermesi beklenirken bulgular bu yönde değildi. Maruziyet grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalan FDX1 seviyelerinin nedeni bilinmezken kuproptoz ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinin çalışma hipotezine göre beklenildiği gibi maruziyet grubunda anlamlı ölçüde

artmamasının sebebi, bakır maruziyetinin kuproptotik ölüm yolağını devreye sokacak düzeyde ve bakır homeostaz mekanizmasını aşacak düzeyde toksik olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmanın bu kapsamda yapılan ilk çalışma olmasından ötürü ve benzer çalışmaların eksikliğinden ötürü elde edilen bulgular sağlıklı düzeyde değerlendirilemedi. Ayrıca FDX1 ve SLC31A1 dışında DLAT, DLS, LIAS, ATP7B gibi kuproptoz ile ilişkili genlerin çalışmaya dahil edilememiş olması kuproptoz ve kronik bakır maruziyeti ilişkisinin değerlendirilmesi noktasında bir eksiklikti. Literatürde kronik bakır maruziyetinin toksik sonucu olarak ispat edilen ROS artışının veya kronik bakır maruziyeti tespiti için doğruluğu ispatlanmış bir biyobelirteçin de çalışma kapsamına alınamadığı ve çalışmaya dahil edilen bireylerin hücresel düzeyde bakıra maruz kalma durumlarının ispat edilememiş olması da bir diğer sınırlayıcı noktadır. Bu çalışmada çalışmaya dahil edilen bireylerin gönüllü bilgi formunda beyan ettikleri bilgiler esas alınarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Her ne kadar bakıra maruz kalma ihtimalinin en yüksek olduğu bakır madeni çalışanları ve madende çalışmayan bireyler özelinde bir değerlendirme yapılmış olsa da bireylerin yaşadıkları çevre, beslenme şekilleri, ev ortamında kullanılan eşyalar, kullandıkları içme suları gibi özelliklerin değerlendirilmeye alınamamış olması da sonuçları etkileyebilecek bir olgu olabilir ve çalışmanın bir eksikliğidir. Ayrıca bireylerin klinik özellikleri bilinmediğinden ötürü beklenmeyen sonuçların yorumlanması noktasında da eksiklikler doğmuştur.

Tüm bunların ötesinde kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışma olan bu çalışma literatüre katkıda bulunmuştur. Kronik bakır maruziyetinin ispat edilmiş toksik sonuçları düşünüldüğünde bakır maruziyetinin toksik sonuçlarının incelenmesinin önemli bir araştırma konusu olduğu ve bu alanda büyük bir bilgi eksikliğinin olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ

Kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine etkilerini araştırdığımız bu çalışmada ortalama 15 yıl bir bakır madeninde çalışmış/çalışan bireyler ve kontrol grubunda kuproptoz ile ilişkili genler FDX ve SLC31A1'in ifade düzeyleri qPCR ile araştırıldı. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bakıra maruz kalan bireylerde kontrol grubuna kıyasla kuproptoz ile ilişki genler FDX1 ve SLC31A1 ifade düzeylerinde anlamlı düzeyde artış gözlenmedi. Aksine FDX1 ifade düzeylerinin bakıra maruz kalan bireylere kıyasla kontrol grubunda anlamlı düzeyde arttığı görüldü.

Bakıra maruz kalma süresi, sigara içme durumu ve yaş gibi parametrelerin gen ifade düzeyleri üzerinde anlamlı etkisi olmadığı görüldü. Diğer bir taraftan FDX1 geni ifade düzeylerinde, kontrol grubu özelinde sigara içen bireylerde içmeyen bireylere kıyasla anlamlı artış tespit edildi.

İki gen arasındaki korelasyona bakıldığında bakıra maruz kalan bireylerde SLC31A1 ve FDX1 ifade düzeyleri arasında pozitif yönde orta düzeyde korelasyon saptandı ve bu değer anlamlılık değerine oldukça yakındı.

Elde edilen bütün sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde kronik bakır maruziyetinin kuproptoz yolağı üzerine bir etkisinin olmadığı, FDX1 ve SLC31A1 genlerinin kronik bakır maruziyeti tespiti için uygun biyobelirteçler olmadığı yorumlandı fakat çalışmanın eksik yönleri, beklenmeyen ve açıklanamayan sonuçlar hesaba katıldığında sonuçların doğru bir şekilde değerlendirilmesi adına bu alanda daha fazla çalışmanın gerekliliğine karar verildi.

Diğer bir taraftan bu çalışmanın kronik bakır maruziyetinin insanlar üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirildiği az sayıda çalışmadan biri olduğu ve kuproptoz özelinde bu kapsamda yapılan ilk çalışma olduğu düşünüldüğünde literatüre değerli katkılar sağladığı söylenebilir. Bu alanda yapılacak çalışmalar için kaynak niteliğinde olabilecek bu araştırmada ayrıca insanlarda bakır toksisitesinin değerlendirilmesinin gerekliliğinin önemi vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abou Zeid, C., & Kaler, S. G. (2019). Normal human copper metabolism. In *Wilson Disease* (pp. 17-22): Elsevier.
- Ahmad, A., Burns, C. S., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2012). Peculiarities of copper binding to α -synuclein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 29(4), 825-842.
- Akyilmaz, E., Yorganci, E., & Asav, E. (2010). Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. *Bioelectrochemistry*, 78(2), 155-160.
- Ala, A., Walker, A. P., Ashkan, K., Dooley, J. S., & Schilsky, M. L. (2007). Wilson's disease. *the Lancet*, 369(9559), 397-408.
- Antonucci, L., Porcu, C., Iannucci, G., Balsano, C., & Barbaro, B. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease and nutritional implications: special focus on copper. *Nutrients*, 9(10), 1137.
- Araya, M., Pizarro, F., Olivares, M., Arredondo, M., Gonzalez, M., & Méndez, M. (2006). Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. *Biological research*, 39(1), 183-187.
- Aschner, M., Skalny, A. V., Martins, A. C., Sinitskii, A. I., Farina, M., Lu, R., . . . Tinkov, A. A. (2022). Ferroptosis as a mechanism of non-ferrous metal toxicity. *Archives of toxicology*, 96(9), 2391-2417.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *the Lancet*, 377(9770), 1019-1031.
- Banci, L., Bertini, I., McGreevy, K. S., & Rosato, A. (2010). Molecular recognition in copper trafficking. *Natural product reports*, 27(5), 695-710.
- Bandyopadhyay, U., Das, D., & Banerjee, R. K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current science*, 658-666.
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, 21(3), 389-395.
- Bhattacharjee, A., Chakraborty, K., & Shukla, A. (2017). Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics*, 9(10), 1376-1388.
- Bisaglia, M., & Bubacco, L. (2020). Copper Ions and Parkinson's disease: why is homeostasis so relevant? *Biomolecules*, 10(2), 195.
- Blockhuys, S., Celauro, E., Hildesjö, C., Feizi, A., Stål, O., Fierro-González, J. C., & Wittung-Stafshede, P. (2017). Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Metallomics*, 9(2), 112-123.
- Boyd, S. D., Ullrich, M. S., Skopp, A., & Winkler, D. D. (2020). Copper sources for Sod1 activation. *Antioxidants*, 9(6), 500.
- Brady, D. C., Crowe, M. S., Turski, M. L., Hobbs, G. A., Yao, X., Chaikuad, A., . . . Thiele, D. J. (2014). Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature*, 509(7501), 492-496.
- Brewer, G. J. (2009). The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer's disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 28(3), 238-242.

- Brischigliaro, M., & Zeviani, M. (2021). Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1862(1), 148335.
- Brown, R. M., Head, R. A., Boubriak, I. I., Leonard, J. V., Thomas, N. H., & Brown, G. K. (2004). Mutations in the gene for the E1 β subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Human genetics*, 115, 123-127.
- Bucossi, S., Ventriglia, M., Panetta, V., Salustri, C., Pasqualetti, P., Mariani, S., . . . Squitti, R. (2011). Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(1), 175-185.
- Burstein, E., Ganesh, L., Dick, R. D., van De Sluis, B., Wilkinson, J. C., Klomp, L. W. J., . . . Duckett, C. S. (2004). A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *The EMBO journal*, 23(1), 244-254.
- Carr, H. S., George, G. N., & Winge, D. R. (2002). Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome oxidase assembly, is a Cu (I)-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 31237-31242.
- Cervantes-Cervantes, M. P., Calderón-Salinas, J. V., Albores, A., & Muñoz-Sánchez, J. L. (2005). Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biological trace element research*, 103, 229-248.
- Chen, J., Jiang, Y., Shi, H., Peng, Y., Fan, X., & Li, C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472, 1415-1429.
- Chen, L., Min, J., & Wang, F. (2022). Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 378.
- Chen, R. (1996). An analysis program for occupational cohort mortality and update cancer risk in copper miners. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 9(4), 301-308.
- Chen, R., Wei, L., & Huang, H. (1993). Mortality from lung cancer among copper miners. *Occupational and Environmental Medicine*, 50(6), 505-509.
- Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*, 14(8), 535-546.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), 1-16.
- Collins, J. F. (2020). Chapter 24 - Copper. In B. P. Marriott, D. F. Birt, V. A. Stallings, & A. A. Yates (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition)* (pp. 409-427): Academic Press.
- Collins, J. F., & Klevay, L. M. (2011). Copper. *Advances in Nutrition*, 2(6), 520-522. doi:<https://doi.org/10.3945/an.111.001222>
- Contet, C., Goulding, S. P., Kuljis, D. A., & Barth, A. L. (2016). BK channels in the central nervous system. *International review of neurobiology*, 128, 281-342.
- Cooper G., Hausman R. Hücre, Hücre İçi Sinyal İletimi (602-645), çev.Neşe Atabey, Ersan Kalay, Meral Sakızlı, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2016
- Craig, P. M., Galus, M., Wood, C. M., & McClelland, G. B. (2009). Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(2), R362-R373.

- Crisponi, G., Nurchi, V. M., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., & Faa, G. (2010). Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology. *Coordination chemistry reviews*, 254(7-8), 876-889.
- Cronan, J. E. (2016). Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 429-450.
- Curnock, R., & Cullen, P. J. (2020). Mammalian copper homeostasis requires retromer-dependent recycling of the high-affinity copper transporter 1. *Journal of cell science*, 133(16), jcs249201.
- Da, S. (2019). Oxidative stress and genotoxicity among workers exposed to copper in a factory for non-ferrous industry in Egypt. *Egyptian Journal of Occupational Medicine*, 43(1), 1-15.
- Dahn, M. L., Dean, C. A., Jo, D. B., Coyle, K. M., & Marcato, P. (2021). Human-specific GAPDH RT-PCR is an accurate and sensitive method of xenograft metastasis quantification. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 20, 398-408.
- Danzeisen, R., Araya, M., Harrison, B., Keen, C., Solioz, M., Thiele, D., & McArdle, H. J. (2007). How reliable and robust are current biomarkers for copper status? *British Journal of Nutrition*, 98(4), 676-683.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., . . . Bottomley, W. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
- De Olivera, J. V. D., Bouffleur, L. A., Santos, C. E. I. D., Dias, J. F., Squeff, C. H., Silva, G. R. G., . . . Silva, J. D. (2012). Occupational genotoxicity among copper smelters. *Toxicology and Industrial Health*, 28(9), 789-795.
- Deng, H., Zhu, S., Yang, H., Cui, H., Guo, H., Deng, J., . . . Xu, Z. (2023). The dysregulation of inflammatory pathways triggered by copper exposure. *Biological trace element research*, 201(2), 539-548.
- Denoyer, D., Clatworthy, S. A. S., Masaldan, S., Meggyesy, P. M., & Cater, M. A. (2015). Heterogeneous copper concentrations in cancerous human prostate tissues. *The Prostate*, 75(14), 1510-1517.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., . . . Yang, W. S. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *cell*, 149(5), 1060-1072.
- Doguer, C., Ha, J.-H., & Collins, J. F. (2018). Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver. *Comprehensive Physiology*, 8(4), 1433.
- Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C., & Stockwell, B. R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer cell*, 3(3), 285-296.
- Dorsey, A., & Ingberman, L. (2004). Toxicological profile for copper.
- Duarte, I. F., Caio, J., Moedas, M. F., Rodrigues, L. A., Leandro, A. P., Rivera, I. A., & Silva, M. F. B. (2021). Dihydrolipoamide dehydrogenase, pyruvate oxidation, and acetylation-dependent mechanisms intersecting drug iatrogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-18.
- Eleutherio, E. C. A., Magalhães, R. S. S., de Araújo Brasil, A., Neto, J. R. M., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of biochemistry and biophysics*, 697, 108701.
- Espinoza, A., Le Blanc, S., Olivares, M., Pizarro, F., Ruz, M., & Arredondo, M. (2012). Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human

- copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biological trace element research*, 146, 281-286.
- Fang, A. P., Chen, P. Y., Wang, X. Y., Liu, Z. Y., Zhang, D. M., Luo, Y., . . . Zhou, Z. G. (2019). Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort. *International journal of cancer*, 144(11), 2823-2832.
- Farsipour, B., Faghihi-Zarandi, A., Mozaffari, A., & Karami-Mohajeri, S. (2019). Immune response and oxidative stress in workers of a copper concentration factory. *International Journal of Workplace Health Management*.
- Feher, J. (2012). 4.2 - Cells, Synapses, and Neurotransmitters. In J. Feher (Ed.), *Quantitative Human Physiology* (pp. 307-320). Boston: Academic Press.
- Feng, W., Ye, F., Xue, W., Zhou, Z., & Kang, Y. J. (2009). Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Molecular pharmacology*, 75(1), 174-182.
- Feng, Y., Zeng, J.-W., Ma, Q., Zhang, S., Tang, J., & Feng, J.-F. (2020). Serum copper and zinc levels in breast cancer: A meta-analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126629.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669-676.
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*, 33, 291-353.
- Finney, J., Moon, H.-J., Ronnebaum, T., Lantz, M., & Mure, M. (2014). Human copper-dependent amine oxidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 546, 19-32.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*(1), 10-13.
- Franklin, W. A., Aisner, D. L., Post, M. D., Bunn, P. A., & Garcia, M. V. (2014). 17 - Pathology, Biomarkers, and Molecular Diagnostics. In J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan, & J. E. Tepper (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology* (Fifth Edition) (pp. 226-252.e226). Philadelphia: Churchill Livingstone.
- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology mechanisms and methods*, 30(3), 167-176.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*, 88, 1929-1938.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163.
- Garza, N. M., Swaminathan, A. B., Maremanda, K. P., Zulkifli, M., & Gohil, V. M. (2022). Mitochondrial copper in human genetic disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*.
- Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie* (Warsaw, Poland: 1960), 57(9-10), 453-455.
- Ge, E. J., Bush, A. I., Casini, A., Cobine, P. A., Cross, J. R., DeNicola, G. M., . . . Gupta, S. (2022). Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nature Reviews Cancer*, 22(2), 102-113.
- Giglio, S., Monis, P. T., & Saint, C. P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic acids research*, 31(22), e136-e136.

- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2013). Ros. *Current Biology*, 23(3), R100-R102.
- Gonzalez-Lopez, E., & Vrana, K. E. (2020). Dopamine beta-hydroxylase and its genetic variants in human health and disease. *Journal of neurochemistry*, 152(2), 157-181.
- Grasso, M., Bond, G. J., Kim, Y.-J., Boyd, S., Dzebo, M. M., Valenzuela, S., . . . Blackburn, N. J. (2021). The copper chaperone CCS facilitates copper binding to MEK1/2 to promote kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6).
- Gromadzka, G., Tarnacka, B., Flaga, A., & Adamczyk, A. (2020). Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—Therapeutic implications. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9259.
- GÜNel, T., & Aydinli, K. (2009). Real-Time PCR and applications area. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*(2), 43-45.
- Guo, J., Cheng, J., Zheng, N., Zhang, X., Dai, X., Zhang, L., . . . Wu, D. (2021). Copper Promotes Tumorigenesis by Activating the PDK1-AKT Oncogenic Pathway in a Copper Transporter 1 Dependent Manner. *Advanced science*, 8(18), 2004303.
- Gupte, A., & Mumper, R. J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 35(1), 32-46.
- Habarou, F., Hamel, Y., Haack, T. B., Feichtinger, R. G., Lebigot, E., Marquardt, I., . . . Grisel, C. (2017). Biallelic mutations in LIPT2 cause a mitochondrial lipoylation defect associated with severe neonatal encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 101(2), 283-290.
- Hamza, I., Faisst, A., Prohaska, J., Chen, J., Gruss, P., & Gitlin, J. D. (2001). The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6848-6852.
- Hatori, Y., & Lutsenko, S. (2013). An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 945-957.
- Hatori, Y., & Lutsenko, S. (2016). The role of copper chaperone Atox1 in coupling redox homeostasis to intracellular copper distribution. *Antioxidants*, 5(3), 25.
- He, F., Chang, C., Liu, B., Li, Z., Li, H., Cai, N., & Wang, H.-H. (2019). Copper (II) ions activate ligand-independent Receptor Tyrosine Kinase (RTK) signaling pathway. *BioMed Research International*, 2019.
- He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 425.
- Henckens, M., & Worrell, E. (2020). Reviewing the availability of copper and nickel for future generations. The balance between production growth, sustainability and recycling rates. *Journal of Cleaner Production*, 264, 121460.
- Hendricks, A. L., Wachnowsky, C., Fries, B., Fidai, I., & Cowan, J. A. (2021). Characterization and reconstitution of human lipoyl synthase (LIAS) supports ISCA2 and ISCU as primary cluster donors and an ordered mechanism of cluster Assembly. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1598.
- Hennig, J., Andréßen, C., Museth, A. K., Lundstrom, P., Tibell, L. A. E., & Jonsson, B.-H. (2015). Local destabilization of the metal-binding region in human copper–zinc superoxide dismutase by remote mutations is a possible determinant for progression of ALS. *Biochemistry*, 54(2), 323-333.
- Herman, S., Lipiński, P., Starzyński, R., Bednarz, A., Grzmil, P., & Lenartowicz, M. (2022). Molecular Mechanisms of Cellular Copper Homeostasis in Mammals. *Folia Biologica (Kraków)*, 70(4), 201-212.

- Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., & Kocot, J. (2014). The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27, 611-621.
- Horng, Y.-C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S., & Winge, D. R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35334-35340.
- Hussain, A. R., Siraj, A. K., Ahmed, M., Bu, R., Pratheeshkumar, P., Alrashed, A. M., . . . Beg, S. (2017). XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis. *BMC cancer*, 17(1), 1-13.
- Iakovidis, I., Delimaris, I., & Piperakis, S. M. (2011). Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Molecular biology international*, 2011.
- Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124-127.
- Jiang, L., Garrick, M. D., Garrick, L. M., Zhao, L., & Collins, J. F. (2013). Divalent metal transporter 1 (Dmt1) mediates copper transport in the duodenum of iron-deficient rats and when overexpressed in iron-deprived HEK-293 cells. *The Journal of nutrition*, 143(12), 1927-1933.
- Kang, Z., Qiao, N., Liu, G., Chen, H., Tang, Z., & Li, Y. (2019). Copper-induced apoptosis and autophagy through oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction in male germ cells. *Toxicology in Vitro*, 61, 104639.
- Kawakami, M., Inagawa, R., Hosokawa, T., Saito, T., & Kurasaki, M. (2008). Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food and chemical toxicology*, 46(6), 2157-2164.
- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2008). Different regulation of wild-type and mutant Cu, Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Human molecular genetics*, 17(21), 3303-3317.
- Khoshdel, Z., Naghibalhossaini, F., Abdollahi, K., Shojaei, S., Moradi, M., & Malekzadeh, M. (2016). Serum copper and zinc levels among Iranian colorectal cancer patients. *Biological trace element research*, 170, 294-299.
- Kim, B.-E., Nevitt, T., & Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature chemical biology*, 4(3), 176-185.
- Krishnamoorthy, L., Cotruvo Jr, J. A., Chan, J., Kaluarachchi, H., Muchenditsi, A., Pendyala, V. S., . . . Wal, M. N. V. (2016). Copper regulates cyclic-AMP-dependent lipolysis. *Nature chemical biology*, 12(8), 586-592.
- Kumar, S., Khaliq, F., Singh, S., Ahmed, R., Kumar, R., Deshmukh, P. S., & Banerjee, B. D. (2016). Pulmonary functions, oxidative stress and DNA damage in workers of a copper processing industry. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 7(2), 107.
- Kuratsune, M., Tokudome, S., Shirakusa, T., Yoshida, M., Tokumitsu, Y., Hayano, T., & Seita, M. (1974). Occupational lung cancer among copper smelters. *International journal of cancer*, 13(4), 552-558.
- 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(2), 149-167.

- Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., & Dijkstra, B. W. (2018). Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chemistry–A European Journal*, 24(1), 47-55.
- Lan, A. P., Chen, J., Chai, Z. F., & Hu, Y. (2016). The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *Biometals*, 29, 665-678.
- Leary, S. C., Cobine, P. A., Kaufman, B. A., Guercin, G.-H., Mattman, A., Palaty, J., . . . Horvath, R. (2007). The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell metabolism*, 5(1), 9-20.
- Leary, S. C., Kaufman, B. A., Pellecchia, G., Guercin, G.-H., Mattman, A., Jaksch, M., & Shoubbridge, E. A. (2004). Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Human molecular genetics*, 13(17), 1839-1848.
- Lei, J., Teng, X., Wang, Y., Jiang, X., Zhao, H., Zheng, X., . . . Duan, E. (2022). Plastidic pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit Alpha1 is involved in galactolipid biosynthesis required for amyloplast development in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 20(3), 437-453.
- Leitch, J. M., Yick, P. J., & Culotta, V. C. (2009). The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24679-24683.
- Lelièvre, P., Sancey, L., Coll, J.-L., Deniaud, A., & Busser, B. (2020). The multifaceted roles of copper in cancer: A trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy. *Cancers*, 12(12), 3594.
- Li, J., Cao, F., Yin, H.-l., Huang, Z.-j., Lin, Z.-t., Mao, N., . . . Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell death & disease*, 11(2), 88.
- Li, Y., Chen, H., Liao, J., Chen, K., Javed, M. T., Qiao, N., . . . Tang, Z. (2021). Long-term copper exposure promotes apoptosis and autophagy by inducing oxidative stress in pig testis. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 55140-55153.
- Lin, C., Zhang, Z., Wang, T., Chen, C., & James Kang, Y. (2015). Copper uptake by DMT1: a compensatory mechanism for CTR1 deficiency in human umbilical vein endothelial cells. *Metallomics*, 7(8), 1285-1289.
- Linder, M. C. (2020). Copper homeostasis in mammals, with emphasis on secretion and excretion. A review. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 4932.
- Liu, H., Guo, H., Jian, Z., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., . . . Zhao, L. (2020). Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Liu, Y., Lin, W., Yang, Y., Shao, J., Zhao, H., Wang, G., & Shen, A. (2022). Role of cuproptosis-related gene in lung adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 7156.
- Lu, L., Liang, Q., Shen, S., Feng, L., Jin, L., & Liang, Z. F. (2020). Tobacco smoke plays an important role in initiation and development of lung cancer by promoting the characteristics of cancer stem cells. *Cancer management and research*, 9735-9739.
- Lutsenko, S. (2010). Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current opinion in chemical biology*, 14(2), 211-217.
- M. Fetherolf, M., Boyd, S. D., Winkler, D. D., & Winge, D. R. (2017). Oxygen-dependent activation of Cu, Zn-superoxide dismutase-1. *Metallomics*, 9(8), 1047-1059.

- Ma, Z., Wong, K. Y., & Horrigan, F. T. (2008). An extracellular Cu²⁺ binding site in the voltage sensor of BK and Shaker potassium channels. *The Journal of General Physiology*, 131(5), 483-502.
- Maher, P. (2018). Potentiation of glutathione loss and nerve cell death by the transition metals iron and copper: Implications for age-related neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 115, 92-104.
- Mathys, Z. K., & White, A. R. (2017). Copper and Alzheimer's disease. *Neurotoxicity of Metals*, 199-216.
- McMillin, G. A., Travis, J. J., & Hunt, J. W. (2009). Direct measurement of free copper in serum or plasma ultrafiltrate. *American journal of clinical pathology*, 131(2), 160-165.
- Meredyth Jones, D. V. M., & van der Merwe Bvs, D. (2008). Copper Toxicity in Sheep is on the Rise in Kansas and Nebraska.
- Miyayama, T., Ishizuka, Y., Iijima, T., Hiraoka, D., & Ogra, Y. (2011). Roles of copper chaperone for superoxide dismutase 1 and metallothionein in copper homeostasis. *Metallomics*, 3(7), 693-701.
- Mizutani, Y., Nakanishi, H., Li, Y. N., Matsubara, H., Yamamoto, K., Sato, N., . . . Okihara, K. (2007). Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis. *International journal of oncology*, 30(4), 919-925.
- Mufti, A. R., Burstein, E., Csomos, R. A., Graf, P. C. F., Wilkinson, J. C., Dick, R. D., . . . Su, G. L. (2006). XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Molecular cell*, 21(6), 775-785.
- Mufti, A. R., Burstein, E., & Duckett, C. S. (2007). XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 463(2), 168-174.
- Muller, P. A. J., & Klomp, L. W. J. (2009). ATOX1: a novel copper-responsive transcription factor in mammals? *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(6), 1233-1236.
- Mytilineou, C., Kramer, B. C., & Yabut, J. A. (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism & related disorders*, 8(6), 385-387.
- National Center For Biotechnology Information, Erişim Tarihi: 26.04.2023 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J. P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), 674-679.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloredutases. *Blood*, 108(4), 1388-1394.
- Osredkar, J., & Sustar, N. (2011). Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clinic Toxicol S*, 3(2161), 0495.
- Palus, J., Lewinska, D., Dziubaltowska, E., Stepnik, M., Beck, J., Rydzynski, K., & Nilsson, R. (2005). DNA damage in leukocytes of workers occupationally exposed to arsenic in copper smelters. *Environmental and molecular mutagenesis*, 46(2), 81-87.
- Pan, S., Song, C., Meng, H., Li, N., Li, D., Hao, B., . . . Geng, Q. (2022). Identification of cuproptosis-related subtypes in lung adenocarcinoma and its potential significance. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., . . . Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., . . . Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-21.
- Puig, S., & Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 171-180.
- Ramos, D., Mar, D., Ishida, M., Vargas, R., Gaite, M., Montgomery, A., & Linder, M. C. (2016). Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PloS one*, 11(3), e0149516.
- Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17(25), 3225-3236.
- Ren, X., Li, Y., Zhou, Y., Hu, W., Yang, C., Jing, Q., . . . Wang, L. (2021). Overcoming the compensatory elevation of NRF2 renders hepatocellular carcinoma cells more vulnerable to disulfiram/copper-induced ferroptosis. *Redox biology*, 46, 102122.
- Rigiracciolo, D. C., Scarpelli, A., Lappano, R., Pisano, A., Santolla, M. F., De Marco, P., . . . Belfiore, A. (2015). Copper activates HIF-1 α /GPER/VEGF signalling in cancer cells. *Oncotarget*, 6(33), 34158.
- Roelofsen, H., Wolters, H., Van Luyn, M. J. A., Miura, N., Kuipers, F., & Vonk, R. J. (2000). Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*, 119(3), 782-793.
- Royer, A., & Sharman, T. (2020). Copper toxicity.
- Sadak, O. (2023). Chemical sensing of heavy metals in water. In *Advanced Sensor Technology* (pp. 565-591): Elsevier.
- Saha, A., Karnik, A., Sathawara, N., Kulkarni, P., & Singh, V. (2008). Ceruloplasmin as a marker of occupational copper exposure. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 18(3), 332-337.
- Saleh, S. A. K., Adly, H. M., Abdelkhalik, A. A., & Nassir, A. M. (2020). Serum levels of selenium, zinc, copper, manganese, and iron in prostate cancer patients. *Current urology*, 14(1), 44-49.
- Scheiber, I., Dringen, R., & Mercer, J. F. B. (2013). Copper: effects of deficiency and overload. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, 359-387.
- Schmidt, K., Ralle, M., Schaffer, T., Jayakanthan, S., Bari, B., Muchenditsi, A., & Lutsenko, S. (2018). ATP7A and ATP7B copper transporters have distinct functions in the regulation of neuronal dopamine- β -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 293(52), 20085-20098.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Shah, K. R., Guan, X., & Yan, J. (2022). Structural and functional coupling of calcium-activated BK channels and calcium-permeable channels within nanodomain signaling complexes. *Frontiers in Physiology*, 12, 2556.
- Shahrokhi, S., Zavar Reza, J., Andishmand, S., Momtaz, S. M., & Zare Sakhvidi, M. J. (2021). Genotoxic evaluation and plasma oxidative stress markers in copper smelters. *Toxin Reviews*, 40(2), 172-178.
- Shanbhag, V. C., Gudekar, N., Jasmer, K., Papageorgiou, C., Singh, K., & Petris, M. J. (2021). Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1868(2), 118893.
- Shubber, E., Amin, N. S., & El-Adhami, B. H. (1998). Cytogenetic effects of copper-containing intrauterine contraceptive device (IUCD) on blood lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417(2-3), 57-63.

- Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays in biochemistry*, 62(3), 255-270.
- Singleton, W. C. J., McInnes, K. T., Cater, M. A., Winnall, W. R., McKirdy, R., Yu, Y., . . . Mercer, J. F. B. (2010). Role of glutaredoxin1 and glutathione in regulating the activity of the copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27111-27121.
- Squitti, R., & Polimanti, R. (2013). Copper phenotype in Alzheimer's disease: dissecting the pathway. *American journal of neurodegenerative disease*, 2(2), 46.
- Squitti, R., Simonelli, I., Ventriglia, M., Siotto, M., Pasqualetti, P., Rembach, A., . . . Bush, A. I. (2014). Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 38(4), 809-822.
- Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(6), 1252-1263.
- Srivastava, S., Panda, S., Li, Z., Fuhs, S. R., Hunter, T., Thiele, D. J., . . . Skolnik, E. Y. (2016). Histidine phosphorylation relieves copper inhibition in the mammalian potassium channel KCa3.1. *Elife*, 5, e16093.
- Suzuki, K. T., Someya, A., Komada, Y., & Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of inorganic biochemistry*, 88(2), 173-182.
- Tang, D., Chen, X., & Kroemer, G. (2022). Cuproptosis: a copper-triggered modality of mitochondrial cell death. *Cell research*, 32(5), 417-418.
- Tang, D., & Kroemer, G. (2020). Ferroptosis. *Current Biology*, 30(21), R1292-R1297.
- Thelen, J. J., Muszynski, M. G., David, N. R., Luethy, M. H., Elthon, T. E., Miernyk, J. A., & Randall, D. D. (1999). The dihydrolipoamide S-acetyltransferase subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex from maize contains a single lipoyl domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21769-21775.
- Tian, F., Xiao, Y., Li, X., Zhai, Q., Wang, G., Zhang, Q., . . . Chen, W. (2015). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice. *PloS one*, 10(11), e0143318.
- Tsang, T., Davis, C. I., & Brady, D. C. (2021). Copper biology. *Current Biology*, 31(9), R421-R427.
- Tsang, T., Posimo, J. M., Gudiel, A. A., Cicchini, M., Feldser, D. M., & Brady, D. C. (2020). Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma. *Nature cell biology*, 22(4), 412-424.
- Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., . . . Spangler, R. D. (2022). Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, 375(6586), 1254-1261.
- Tsvetkov, P., Detappe, A., Cai, K., Keys, H. R., Brune, Z., Ying, W., . . . Rossen, J. (2019). Mitochondrial metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress. *Nature chemical biology*, 15(7), 681-689.
- Tümer, Z., & Møller, L. B. (2010). Menkes disease. *European Journal of Human Genetics*, 18(5), 511-518.
- Turski, M. L., Brady, D. C., Kim, H. J., Kim, B.-E., Nose, Y., Counter, C. M., . . . Thiele, D. J. (2012). A novel role for copper in Ras/mitogen-activated protein kinase signaling. *Molecular and cellular biology*, 32(7), 1284-1295.

- Uauy, R., Maass, A., & Araya, M. (2008). Estimating risk from copper excess in human populations. *The American journal of clinical nutrition*, 88(3), 867S-871S.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2), 120-139.
- Vitaliti, A., De Luca, A., & Rossi, L. (2022). Copper-dependent kinases and their role in cancer inception, progression and metastasis. *Biomolecules*, 12(10), 1520.
- Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9.
- Wan, F., Zhong, G., Ning, Z., Liao, J., Yu, W., Wang, C., . . . Tang, Z. (2020). Long-term exposure to copper induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in rat kidneys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110158.
- Wang, T.-H., Hsia, S.-M., & Shieh, T.-M. (2016). Lysyl oxidase and the tumor microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 62.
- Wee, N. K. Y., Weinstein, D. C., Fraser, S. T., & Assinder, S. J. (2013). The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(5), 960-963.
- Wittung-Stafshede, P. (2021). Another pearl in the “copper-transport” necklace. *Biophysical Journal*, 120(20), 4305-4306.
- Wu, Z., Zhang, W., & Kang, Y. J. (2019). Copper affects the binding of HIF-1 α to the critical motifs of its target genes. *Metallomics*, 11(2), 429-438.
- Xie, J., Yang, Y., Gao, Y., & He, J. (2023). Cuproptosis: mechanisms and links with cancers. *Molecular Cancer*, 22(1), 46.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1).
- Xue, Q., Yan, D., Chen, X., Li, X., Kang, R., Klionsky, D. J., . . . Liu, J. (2023). Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis. *Autophagy*(just-accepted).
- Yadav, M., Gupta, R., & Sharma, R. K. (2019). Green and sustainable pathways for wastewater purification. In *Advances in water purification techniques* (pp. 355-383): Elsevier.
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, W. S., Fridman, D. J., . . . Boniface, J. J. (2007). RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 447(7146), 865-869.
- Yan, K. U. O., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y. I., & Zhou, X. I. N. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery. *Molecular medicine reports*, 13(5), 3715-3723.
- Yang, M., Chen, P., Liu, J., Zhu, S., Kroemer, G., Klionsky, D. J., . . . Tang, D. (2019). Clockophagy is a novel selective autophagy process favoring ferroptosis. *Science advances*, 5(7), eaaw2238.
- Yang, M., Wu, X., Hu, J., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, L., . . . Liao, L. (2022). COMMD10 inhibits HIF1 α /CP loop to enhance ferroptosis and radiosensitivity by disrupting Cu-Fe balance in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 76(5), 1138-1150.
- Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2008). Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chemistry & biology*, 15(3), 234-245.

- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in biochemistry*, 61(6), 585-596.
- Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2018). ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 21-27.
- Zhai, Q., Ji, H., Zheng, Z., Yu, X., Sun, L., & Liu, X. (2000). Copper induces apoptosis in BA/F3 β cells: Bax, reactive oxygen species, and NF κ B are involved. *Journal of cellular physiology*, 184(2), 161-170.
- Zhang, X., & Yang, Q. (2018). Association between serum copper levels and lung cancer risk: A meta-analysis. *Journal of International Medical Research*, 46(12), 4863-4873.
- Zhang, Y., Zhou, Q., Lu, L., Su, Y., Shi, W., Zhang, H., . . . Yin, L. (2023). Copper Induces Cognitive Impairment in Mice via Modulation of Cuproptosis and CREB Signaling. *Nutrients* 2023, 15, 972. In.
- Zhong, G., Li, L., Li, Y., Ma, F., Liao, J., Li, Y., . . . Tang, Z. (2023). Cuproptosis is involved in copper-induced hepatotoxicity in chickens. *Science of The Total Environment*, 161458.
- Zimnicka, A. M., Maryon, E. B., & Kaplan, J. H. (2007). Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: implications for copper homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26471-26480.
- Zulkifli, M., Spelbring, A. N., Zhang, Y., Soma, S., Chen, S., Li, L., . . . Chen, T.-Y. (2023). FDX1-dependent and independent mechanisms of elesclomol-mediated intracellular copper delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(10), e2216722120.

EKLER

Ek.1 Klinik araştırmalar etik kurulu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/781-851

30.12.2022

Sayın Doç. Dr. Sercan Ergün

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Kronik Bakır Maruziyetinin Kuproptoz Yolağı Üzerine Etkileri başlıklı OMÜ KAEK 2022/528 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 14.12.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteğı henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteğı sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliğı ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

Damla KOLCUOĞLU, Güneysu Şehit Kemal Mutlu Fen Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 26.06.2021 tarihinde mezun oldu. 2021 yılında OMÜ LEE Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına giren Damla KOLCUOĞLU orta derecede İngilizce bilmektedir (YDS:80, YÖKDİL:91,25).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0009-0009-8682-5604

Yayınlar:

1. Kolcuoğlu D., Ergün S., Toxic Consequences Of Chronic Copper Exposure, 6. International Congress on Medical Sciences and Multidisciplinary Approaches. 11-12 March 2023, Online (Oral Presentation-Full Text).