

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'İN  
TAVUKLARIN LENFOİD ORGANLARININ EMBRİYONAL GELİŞİMİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

EMRAH SUR

DANIŞMAN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

PROF. DR. İLHAMİ ÇELİK

KONYA-2001

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI  
SÜAF PROJE NO: 97-101

**YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'İN  
TAVUKLARIN LENFOİD ORGANLARININ EMBRİYONAL GELİŞİMİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

EMRAH SUR

DANIŞMAN

PROF. DR. İLHAMİ ÇELİK

KONYA-2001

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'İN**

**TAVUKLARIN LENFOİD ORGANLARININ EMBRİYONAL GELİŞİMİ**

**ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE**

**ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

EMRAH SUR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 04.05.2001 tarihinde sözlü olarak yapılan

tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

(S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No: .....)

**Tez Jürisi:** Jüri Başkanı Prof. Dr. Refik SOYLU .....  
Danışman Prof. Dr. İlhami ÇELİK .....  
Üye Prof. Dr. Hasan CÜCE .....  
Üye Prof. Dr. Mine BALIKÇIER .....  
Üye Doç. Dr. Halis OĞUZ .....

**KISALTMALAR**

<b>ACP-az:</b>	Asit fosfataz
<b>AF:</b>	Aflatoksin
<b>AFB<sub>1</sub>:</b>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>ALP:</b>	Alkalen fosfataz
<b>ALT:</b>	Alanin amino transferaz
<b>ANAE:</b>	Alfa naftil asetat esteraz
<b>AST:</b>	Aspartat amino transferaz
<b>BG-az:</b>	Beta glukuronidaz
<b>GC:</b>	Germinal merkez
<b>GDH:</b>	Glutamik dehidrojenaz
<b>GGT:</b>	Gama glutamil transferaz
<b>ICD:</b>	İsositrik dehidrojenaz
<b>MGP:</b>	Methyl-Green Pyronin
<b>NaF:</b>	Sodyum florid
<b>PAS:</b>	Periodic Acid Schiff
<b>SDH:</b>	Sorbitol dehidrojenaz

**İÇİNDEKİLER**

<b>1.</b>	<b>GİRİŞ .....</b>	<b>1-2</b>
<b>2.</b>	<b>LİTERATÜR BİLGİ .....</b>	<b>3-28</b>
2.1.	Aflatoksinler .....	3
2.1.1.	Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	4
2.1.2.	Aflatoksinlerin toksikokinetik özellikleri .....	5
2.1.2.1.	Emilimi .....	5
2.1.2.2.	Dağılımı .....	5
2.1.2.3.	Biyotransformasyonu .....	5
2.1.2.4.	Vücuttan atılımı .....	7
2.1.3.	Aflatoksinlerin etki mekanizmaları .....	7
2.1.4.	Yemlerde ve hayvansal ürünlerde aflatoksinler .....	8
2.1.5.	Hayvanlarda aflatoksikozis .....	12
2.1.6.	Aflatoksinlerin immünotoksik etkileri .....	16
2.1.7.	Aflatoksinlerin embriyotoksik etkileri .....	18
2.2.	Kanatlılarda Timusun Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi.....	20
2.2.1.	Timusun histolojik yapısı .....	20
2.2.2.	Timusun embriyonal gelişimi .....	21
2.3.	Bursa Fabricii'nin Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi .....	21
2.3.1.	Bursa Fabricii'nin histolojik yapısı .....	21
2.3.2.	Bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimi .....	22
2.4.	Dalağın Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi .....	23
2.4.1.	Dalağın histolojik yapısı .....	23
2.4.2.	Dalağın embriyonal gelişimi .....	24

2.5.	Asit Fosfataz .....	24
2.6.	Beta-Glukuronidaz .....	25
2.7.	Alfa-Naftil Asetat Esteraz .....	26
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>29-34</b>
3.1.	Materyal .....	29
3.1.1.	Yumurta materyali .....	29
3.1.2.	Aflatoksin B <sub>1</sub> .....	29
3.2.	Metot .....	29
3.2.1.	Aflatoksin B <sub>1</sub> solüsyonlarının hazırlanması .....	29
3.2.2.	Deney gruplarının oluşturulması ve AFB <sub>1</sub> solüsyonlarının yumurtalara verilmesi...	30
3.2.3.	Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması .....	31
3.2.4.	Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) demonstrasyonu .....	32
3.2.5.	Asit fosfataz (ACP-az) demonstrasyonu .....	32
3.2.6.	Beta-glukuronidaz (BG-az) demonstrasyonu .....	33
3.2.7.	İstatistiki analizler .....	34
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>35-50</b>
4.1.	Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular .....	35
4.2.	Kontrol ve Deney Gruplarında Timusun Embriyonal Gelişimi .....	36
4.2.1.	Kuluçkanın yedinci günü .....	36
4.2.2.	Kuluçkanın onuncu günü .....	36
4.2.3.	Kuluçkanın onikinci günü .....	36
4.2.4.	Kuluçkanın onüçüncü günü .....	37
4.2.5.	Kuluçkanın onbeşinci günü .....	38

4.2.6.	Kuluçkanın onsekizinci günü .....	39
4.2.7.	Kuluçkadan çıkışın ilk günü .....	40
4.2.8.	Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta .....	40
4.3.	Kontrol ve Deney Gruplarında Bursa Fabricii'nin Embriyonal Gelişimi .....	41
4.3.1.	Kuluçkanın yedinci günü .....	41
4.3.2.	Kuluçkanın onuncu günü .....	41
4.3.3.	Kuluçkanın onikinci günü .....	42
4.3.4.	Kuluçkanın onüçüncü günü .....	42
4.3.5.	Kuluçkanın onbeşinci günü .....	43
4.3.6.	Kuluçkanın onsekizinci günü .....	44
4.3.7.	Kuluçkadan çıkışın ilk günü .....	45
4.3.8.	Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta .....	46
4.4.	Kontrol ve Deney Gruplarında Dalağın Embriyonal Gelişimi .....	47
4.4.1.	Kuluçkanın onikinci günü .....	47
4.4.2.	Kuluçkanın onüçüncü günü .....	47
4.4.3.	Kuluçkanın onbeşinci günü .....	48
4.4.4.	Kuluçkanın onsekizinci günü .....	48
4.4.5.	Kuluçkadan çıkışın ilk günü .....	49
4.4.6.	Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta .....	49
5.	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>51-64</b>
6.	<b>ÖZET</b> .....	<b>65-67</b>
7.	<b>SUMMARY</b> .....	<b>68-69</b>

8.	KAYNAKLAR .....	70-85
9.	ŞEKİLLER .....	86-134
10.	TABLolar .....	135-137
11.	GRAFİKLER .....	138-140
12.	ÖZGEÇMİŞ .....	141
13.	TEŞEKKÜR .....	142





## TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

<b>Grafik 4.1:</b>	Kontrol ve Deney gruplarının infertilite hariç mortalite değerleri .....	<b>138</b>
<b>Grafik 4.2:</b>	Kontrol ve Deney gruplarında saptanan embriyonik ölümlerin Hamburger-Hamilton skalasına göre belirlenen embriyonik gelişme evrelerindeki dağılımları .....	<b>139</b>
<b>Grafik 4.3:</b>	Kontrol ve Deney gruplarında embriyonal gelişmenin farklı dönemlerinde tespit edilen perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranları .....	<b>140</b>
<b>Tablo 2.1:</b>	Çeşitli araştırmacıların hayvansal doku ve gıdalarda tespit ettikleri aflatoksin değerleri .....	<b>11</b>
<b>Tablo 2.2:</b>	Farklı hayvan türlerinde AFB <sub>1</sub> 'in ÖD <sub>50</sub> değerleri .....	<b>13</b>
<b>Tablo 4.1:</b>	Kontrol ve Deney gruplarının mortalite değerleri .....	<b>135</b>
<b>Tablo 4.2:</b>	Kontrol ve Deney gruplarının embriyonal gelişmenin farklı dönemlerine ait olan perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranları .....	<b>136</b>
<b>Tablo 4.3:</b>	Kuluçkadan çıkışın ilk günü ve takip eden dördüncü hafta sonunda perifer kandaki lenfosit oranları ile bu hücrelerde tespit edilen ANAE pozitivite oranları .....	<b>137</b>

## 1. GİRİŞ

Tavuk yemlerinin uygun olmayan koşullarda depolanmasının ortaya çıkardığı en önemli sorunlardan biri, bu yemlerde üreyen küflerin ürettikleri toksik metabolitlerdir. Özellikle *Aspergillus* cinsi küflerin ürettikleri toksik metabolitlerden, sahada en sık izole edilen ve en zararlı olanı aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'dir. Yemlerde bulunan bu ve diğer mikotoksinler yumurta verimini düşürdükleri gibi yumurtaya da geçebildikleri için insan sağlığı açısından da önemli bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bununla birlikte, söz konusu yumurtaların kuluçka randımanında düşüşler meydana gelmekte ve ayrıca bu yumurtalardan çıkan civcivlerin bağışıklık sistemlerinde meydana gelen yetmezlikler, ileride bu civcivlerden beklenen verimi de önemli oranda düşürmektedir. Zira yumurtaya geçen AFB<sub>1</sub>, normal embriyonal gelişimi olumsuz yönde etkilemekte, özellikle timus, dalak ve bursa Fabricii gibi bağışıklık sistemi organlarının embriyonal gelişiminde meydana gelen aksamalar ise daha sonraki dönemlerde bağışıklık sisteminde fonksiyonel yetmezlik olarak karşımıza çıkmaktadır. Böyle hayvanlar çevresel etkenlere karşı çok daha duyarlı olmakta, ayrıca yapılan koruyucu aşılamalara rağmen, yeterli ve etkili bağışıklık yanıtı oluşturmamaktadırlar. Bu durumda aşılama programlarına düzenli olarak uyulmuş olsa bile hayvanlarda yeterli bir korunma sağlanamadığı için istenilen verim düzeyine ulaşmak mümkün olamamaktadır.

Memelilerde olduğu gibi kanatlılarda da timus, T-lenfositlerinin gelişip olgunlaştığı bir primer lenfoid organdır. Bununla birlikte kanatlılarda kloaka'nın dorsalinde yer alan bursa Fabricii de diğer primer lenfoid organ olarak görev yapmakta ve B-lenfositlerinin gelişiminde rol almaktadır. Embriyonal dönemin erken evrelerinde 3.-4. yutak kavisi endoderminden köken alan timus taslağı ve bağırsak endoderminden köken alan bursa Fabricii taslağı içerisine göç eden iri bazofilik köken hücrelerin önemli bir kısmı öncül lenfositlerdir. Bu hücreler çoğalıp olgunlaşarak T- ve B-lenfositlerine özgü yüzey reseptörleri yanında, özellikle T-lenfositler fonksiyonel açıdan gerekli olan bir takım enzimleri de kazanırlar. Embriyonal gelişimin farklı dönemlerinde belirli bir sıra ile kazanılan bu enzimlerin kazanılma sırası ve bunlara sahip olan lenfosit oranlarının belirlenmesi, bağışıklık sisteminin embriyonal gelişimi, fonksiyonları ve canlının bağışıklık sistemi hakkında önemli ip uçları vermektedir. Timus ve bursa Fabricii, canlının cinsel olgunluğa erişmesiyle birlikte involüsyona uğrayarak ortadan kalkmaktadırlar. Dalak ise, gelişip olgunlaşan T- ve B-lenfositlerinin kan yoluyla gelip yerleştikleri, primer

lenfoid organlar ortadan kalktıktan sonra da sürekli olarak bölünüp çoğaldıkları sekonder bir lenfoid organdır.

T-lenfosit olgunlaşması sırasında kazanılan enzimlerden biri olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE), insan, köpek, sığır ve farelerde olduğu gibi tavuklarda da T-lenfositleri için spesifik bir enzim olduğundan, ışık mikroskopik seviyede, gerek kan frotilerinde ve gerekse de doku kesitlerinde T- ve B-lenfositlerinin ayırımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Asit fosfataz (ACP-az) ve beta-glukuronidaz (BG-az) ise insanlarda T-lenfositleri için spesifik iken, tavuklarda da embriyonal dönemin farklı aşamalarında belirli bir sıra ile kazanılmakta ve kuluçka sonrası dönemlerde farklı kan hücrelerinde de bulunabilmektedirler.

Bu enzimlerin embriyonal dönemin hangi evresinde kazanıldıkları ve kuluçkadan çıkışı takip eden erken dönemlerde, perifer kandaki bu enzimler için pozitif reaksiyon veren lenfosit oranları ile bu hücrelerin adı geçen lenfoid organlardaki lokalizasyonlarının bilinmesi oldukça önemlidir. Zira lenfoid organların embriyonal gelişimini olumsuz yönde etkileyecek olan faktörler, bu enzimlerin ortaya çıkışında da aksamalara neden olacaktır. Bu durum göz önüne alındığında, lenfositlerin enzimatik pozitivite oranları ile lenfoid dokulardaki lokalizasyonlarının bilinmesi, toksik maddelerin gerek embriyonal dönemde ve gerekse kuluçkadan çıkışı takip eden dönemlerde neden olacakları zararlı etkilerinin, olası etkiye mekanizmaları ile sonuçlarının ortaya konabilmesinde önemli yararlar sağlayabilecektir. AFB<sub>1</sub> toksini de daha önce bahsedildiği gibi yumurtaya geçerek embriyonun gelişimini olumsuz yönde etkileyen ve saha şartlarında da sıkça karşılaşılan önemli bir problemdir. Bu toksinin, lenfoid organların embriyonal gelişimi üzerine olan etkisinin enzim histokimyasal metotlarla belirlenmesi, yemlerle alındığında yumurtaya da geçen toksinin, böyle yumurtalardan çıkan civcivlerin bağışıklık sistemi organlarının fonksiyonlarında meydana getirebileceği zararlı etkiler hakkında önemli bulgular elde edilmesini sağlayacaktır.

## 2. LİTERATÜR BİLGİ

### 2.1. Aflatoksinler

Aflatoksinler ilk olarak 1960 yılında İngiltere’de 100.000 hindinin ölümüne yol açan ve “Turkey X Disease (Hindi Hastalığı)” olarak isimlendirilen bir toksikozis olayı ile gündeme gelmişlerdir. Bu olaydan kısa bir süre sonra benzeri ölümlere ördek palazları ve sülünlerde de rastlanmış ve toksikasyona neden olan etken olarak, hayvanların yemlerinde yaygın olarak kullanılan Brezilya yer fıstığından şüphe edilmiştir. Daha sonra, rasyonlarında yine bu yem maddesi kullanılan sığır, koyun, domuz ve piliçlerde de hastalığın baş göstermesi sonucu yapılan toksikolojik analizler sonrasında toksinin yer fıstığından köken aldığı tespit edilmiştir. Yapılan daha detaylı çalışmalar sonucunda ise toksik madde izole edilmiş ve kaynağının *Aspergillus flavus* mantarı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Söz konusu toksin 1962’de “aflatoksin” olarak isimlendirilmiştir (Sharby 1978, İstanbulluoğlu ve Arda 1979, Çetin 1990, Leeson 1995). Doğada, yem maddelerinde üreyen küflerin en yaygın ve önemlisi olan *Aspergillus* türlerinin ürettiği aflatoksinlerin çok büyük bir oranı (%75-83) AFB<sub>1</sub>’dir ve bu nedenle aflatoksikozlardan da büyük oranda bu aflatoksin türü sorumludur (Oğuz 1997, Oğuz ve ark 2000b).

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsi içinde yer alan ve özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* türü mantarlar (küfler) tarafından üretilen heterosiklik bir metabolit grubudur. Aflatoksin kelimesi, *Aspergillus flavus*’un “A-” ve “-fla” hecelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Onsekiz ayrı aflatoksin türü bulunmasına karşın, yem ve yem hammaddelerinde en fazla tespit edilen türleri aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>’dir (Leeson 1995). Bu sınıflama aflatoksinlerin ultraviolet ışığı ile aydınlatıldıklarında verdikleri spesifik floresans özelliklerine göre yapılmıştır. Buna göre mavi floresans verenler (Blue) “B”, yeşil floresans verenler ise (Green) “G” harfi ile simgelendirilmiştir (Ellis ve ark 1991).

Bu 4 ana aflatoksin türü dışında, aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinde tespit edilen ve “süt toksini-Milk toxin” olarak da isimlendirilen M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> türleri de bulunmaktadır (Şanlı 1995). Bununla birlikte *A. flavus*’un kültür ortamlarından, aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>’nin hidroksi türevleri olan aflatoksin GM<sub>1</sub> ve GM<sub>2</sub> ile dihidroksi aflatoksin GM<sub>2a</sub> metabolitleri de izole edilmiştir. Benzer şekilde, aynı mantarın kültür ortamında aflatoksin B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>’nin hidroksi türevleri olan ve nispeten daha az toksik olan

aflatoksin B<sub>2a</sub> ve G<sub>2a</sub> alt fraksiyonlarının da bulunduğu bildirilmektedir (Kaya 1998). Ayrıca aflatoksinlerin en yüksek toksisiteye sahip türü olan aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'in metabolizma ürünleri olan aflatoksikol (R<sub>o</sub>), aflatoksin P<sub>1</sub> ve aflatoksin Q<sub>1</sub> de önemli metabolitlerdir (Hatch 1988).

### 2.1.1. Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Aflatoksinler difurokumarolakton'lardandır. Moleküler yapılarının omurgasını B ve M türlerinde bifuran halkası, G türlerinde ise lakton halkası oluşturmaktadır. Pratik olarak suda çözünmeyen aflatoksinler değişik oranlarda etanol, aseton, isopropanol, hekzan-etanol, hekzan-metanol ve hekzan-aseton-su gibi organik çözücülerde çözündürülebilirler (Hatch 1988, Leeson 1995, Şanlı 1995). Yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklı olan bu bileşiklerin özellikle sütle atılan türevlerinin pastörizasyon işleminden bile etkilenmedikleri ve yapılarında çok fazla bir değişiklik olmadığı bildirilmektedir (Kaya 1998).

Küfler klorofil içermediklerinden, kendileri için gerekli olan lipid, karbonhidrat ve proteinleri sentezleyemezler ve bu nedenle de saprofit ya da parazit olarak yaşamak zorundadırlar (Cavalheiro 1981). Ancak her küfün çoğalabilmesi için belirli ortam koşullarının sağlanması gereklidir. *Aspergillus* türlerinin de gelişip aflatoksin üretebilmelerinde belirli çevresel koşulların optimum düzeyde olması gereklidir. Bu koşullar, depolanan yem maddesinin ve çevrenin nisbi nem oranı, depolama sıcaklığı, ortam havasının oksijen oranı, depolama zamanı ve depolanan yemin niteliğidir. Yem maddesinin nem oranının %12-14 (Reddy 1992), ortamın nisbi nem oranının %80-85 (Leeson 1995), depolama sıcaklığının 24-25 °C (Hatch 1988), ortam havasının oksijen oranının %20-90 arasında olması ve su aktivitesinin 0,95-0,99 aw. düzeylerinde olması (Ellis ve ark 1991) durumunda 3-4 gün gibi kısa bir sürede küflenme gerçekleşir. Bununla birlikte pH'nın 4-5 arasında olması (Ellis ve ark 1991) ve özellikle taneli yem maddelerinin kırılmış olması da (Reddy 1992) küflenmeyi hızlandırmaktadır. Bu faktörler dikkate alındığında, yemlerin aflatoksinlerle kontaminasyonu açısından en riskli coğrafi bölgelerin, tropikal iklim şartlarının hüküm sürdüğü ılıman ve nemli bölgeler olduğu görülmektedir (Glavitis ve Salyi 1998). Ülkemizde de özellikle Akdeniz, Marmara ve Karadeniz bölgelerinde bu koşullar sağlanabilmektedir.

### 2.1.2. Aflatoksinlerin toksikokinetik özellikleri

Vücuda giren tüm yabancı moleküller gibi aflatoksinlerin metabolizmasında da emilim, dağılım, biyotransformasyon ve vücuttan atılım aşamaları bulunmaktadır.

**2.1.2.1. Emilimi:** Absorbsiyon, yabancı maddelerin deri ve mukozal membranlar yoluyla kan dolaşımına geçmesidir. Vücutta bulunan absorpsiyon bölgeleri gastro-intestinal kanal, akciğerler ve deridir. Kimyasal maddelerin vücut membranlarından geçiş oranı, onların yağda eriyebilirlikleri ile bağıntılıdır. Aflatoksinler, yağda iyi çözünen bileşikler olduklarından, genellikle gastro-intestinal kanaldan kolaylıkla emilerek kan dolaşımına geçerler (Leeson 1995).

**2.1.2.2. Dağılımı:** Aflatoksinler, büyük oranda yumuşak dokularla yağ dokularında birikirler. Ancak asıl birikim yerleri, toksinin biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbrek gibi organlardır (Leeson 1995).

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in farmakokinetiği üzerinde yapılan çalışmalar, gastro-intestinal kanaldan emilen toksinin, lipoproteinlerden ziyade düşük moleküler ağırlıklı plazma proteinlerine bağlanarak portal dolaşıma geçtiğini ve bu şekilde hepatositlere taşındığını göstermiştir (Wilson ve ark 1985, Busbee ve ark 1990). Ayrıca AFB<sub>1</sub>'in konsantrasyonunun lenf sıvısında çok yavaş bir seyirle ve uzun sürede artarken; plazmadaki maksimum konsantrasyonuna daha hızlı ulaştığı ve bu yüksek seviyesini de uzun süre koruduğu ileri sürülmektedir (Wilson ve ark 1985).

**2.1.2.3. Biyotransformasyonu:** Aflatoksinlerin biyotransformasyonu Faz-I ve Faz-II reaksiyonları olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Faz-I reaksiyonları hidroksilasyon, O-demetilasyon, epoksidasyon ve redüksiyon olaylarını içerir. Bu olaylardan hidroksilasyon, O-demetilasyon ve epoksidasyondan sorumlu olan enzim, agranüler endoplazmik retikulumda yer alan sitokrom p-450 enzimi iken; redüksiyon olaylarından ise sitosolik redüktazlar sorumludurlar (Leeson 1995).

Faz-I reaksiyonları sonrasında AFB<sub>1</sub>'den, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> ve aflatoksikol (R<sub>o</sub>) gibi suda çözünen metabolitler meydana gelir. Bunlardan AFM<sub>1</sub> ve AFQ<sub>1</sub> hidroksilasyon sonucu, özellikle maymun idrarında tespit edilen AFP<sub>1</sub> ise O-demetilasyon olaylarının sonrasında meydana gelirlerken; R<sub>o</sub> olarak da bilinen aflatoksikol ise redüksiyon olayı

sonucunda şekillenir. R<sub>o</sub>, mikrozomal dehidrojenazlar tarafından tekrar AFB<sub>1</sub>'e re-okside olabildiği için AFB<sub>1</sub>'in “depo” formu olarak da bilinir. Epoksidasyon olayında ise DNA'nın nükleofilik bölgelerine yüksek oranda affinite gösteren ve karsinojenik etkiden büyük oranda sorumlu olan 8,9-epoksid türevi oluşur (Leeson 1995).

Yapılan çalışmalarla (Mayura ve ark 1998, Kärenlampi 1987, Geissler ve Faustman 1988, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a) AFB<sub>1</sub>'in metabolizmasında, karaciğer kökenli karma işlevli monooksijenaz enzim sistemlerinin (Mixed function monooxygenase, MFO), sitokrom p-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimlerinin rolleri ortaya konulmuştur.

Neldon-Ortiz ve Qureshi (1992a), MFO'ların, AFB<sub>1</sub>'i daha toksik metabolitlerine dönüştürdüğünü bildirmişlerdir. Nitekim bu araştırmacılar (Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a) önceden MFO ile muamele edilen AFB<sub>1</sub>'in, 4 haftalık piliçlerin peritoneal makrofajlarının koyun eritrositlerini fagosite etme kapasitelerini çok düşük dozlarda bile önemli oranda baskıladığını tespit etmişlerdir.

Kärenlampi (1987) ise fare Hepa-1 ve rat hepatoma hücre kültürleri üzerinde yaptığı çalışmada, aril hidrokarbon hidroksilaz ve sitokrom p-450 enzimlerinin AFB<sub>1</sub>'in toksik etkisini artırdığını, bunun nedeninin de AFB<sub>1</sub>'in söz konusu enzimlerce daha toksik metabolitlerine dönüştürülmesi olduğunu ortaya koymuştur.

Iwaki ve ark (1990) ise, civciv embriyosu primer hepatosit ve fibroblast hücre kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in hepatositler üzerinde daha etkili olduğunu gözlemişler, bunun nedeninin de hepatosit mikrozomlarının fibroblast mikrozomlarına nazaran 10-20 kat daha fazla sitokrom p-450 enzimi içermeleri olduğunu ileri sürmüşlerdir.

AFB<sub>1</sub>'in biyotransformasyonu, akciğerlerdeki *Clara* hücrelerinde de gerçekleşmektedir. Ancak insan akciğerlerinde söz konusu hücrelerin nispeten daha az sayıda olması ve bu hücrelerde biyotransformasyon için gerekli olan p-450 enziminin aktivite yeri olan agranüler endoplazmik retikulum organelinin az gelişmiş olması farklı mekanizmaları akla getirmektedir. AFB<sub>1</sub>'in insan akciğerlerindeki biyoaktivasyonunda p-450 enzimi çok az bir rol üstlenmekte iken, ko-oksidasyon olayı daha önemli bir role sahiptir. Ko-oksidatif biyoaktivasyonun insan akciğerlerindeki AFB<sub>1</sub> karsinojenitesi ile

olan ilişkisi, AFB<sub>1</sub> 8,9-epoksid'i etkisiz hale getiren glutation S-transferaz (GST) enziminin blokajı ile ortaya konulmuştur. Akciğerlerdeki bu biyoaktivasyonun düzeyi hücre tipleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu olayda en önemli role ise makrofajlar sahiptir (Donnelly ve ark 1996).

Aflatoksinlerin biyotransformasyonunda rol alan Faz-II reaksiyonlarında ise, Faz-I reaksiyonlarında şekillenen metabolitlerin vücuttan atılımı kolaylaştırılır. Bu amaçla Faz-I reaksiyonlarında şekillenen metabolitler, glukuronik asit, sülfat, amino asitler, glutathion, metil ya da asetil grupları gibi endojen maddelerle birleştirilirler (konjugasyon).

#### **2.1.2.4. Vücuttan atılımı**

Metabolize olan aflatoksinlerin atılımı konusunda da çeşitli görüşler mevcuttur. Wilson ve ark (1985) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in idrardaki konsantrasyonunun maksimum plazma konsantrasyonundan 70 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Wong ve Hsieh (1980) ise maymunlar da idrarla atılımın, fare ve ratlar da ise safra ile atılımın daha etkin olduğunu öne sürmektedirler. Aynı zamanda dışkı ile atılımın yanında süt ve yumurta ile de önemli oranda bir eliminasyon gerçekleşmektedir (Stubblefield ve ark 1983, Obioha ve ark 1986, Harvey ve ark 1991, Galtier 1998).

#### **2.1.3. Aflatoksinlerin etki mekanizmaları**

Mikotoksinler ve özellikle aflatoksinlerin genel etki mekanizmaları, DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir (Meneghini ve Schumacher 1977, Jeffery ve ark 1984). Aflatoksin türleri içerisinde en toksik tür olarak bilinen AFB<sub>1</sub>'in toksisitesinden ise kendisinin değil, sitokrom p-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz gibi bir takım enzimlerin etkileri sonucu ortaya çıkan metabolitlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Kärenlampi 1987, Iwaki ve ark 1990, Cavin ve ark 1998).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, AFB<sub>1</sub> metabolitlerinin hücre DNA'sı ile reaksiyona girerek mutasyona sebep olduğunu göstermektedir (Iwaki ve ark 1990, Vidyasagar ve ark 1997, Gradelet ve ark 1998). Benasutti ve ark (1988), AFB<sub>1</sub> -8,9 epoksidin DNA'daki N<sup>7</sup>-guanin ile bir kompleks oluşturduğunu ortaya koyarlarken; Lyman ve ark (1988)'da hedef bazın guanin olduğunu, bununla birlikte ribozomların da AFB<sub>1</sub> tarafından modifikasyona uğratıldığını ileri sürmüşlerdir. Cıvciv kondrosit kültürlerinde yapılan bir başka çalışmada ise (Kichou ve Walser 1994) AFB<sub>1</sub>'in,



proteoglikan sentezinden çok DNA sentezini inhibe ettiği ve bunun da doza bağlı olduğu ortaya konulmuştur. Harris ve ark (1998)'nin rat hepatosit kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in kortikosteroid bağlayıcı globulin (CBG), sitokrom p-450 4F<sub>1</sub> (Cyp4F1), alfa-2-mikroglobulin, C4b-bağlayıcı protein (C4BP), serum amiloid A<sub>2</sub> ve glutathion S-transferaz Yb2 (GST)'nin sentezinden sorumlu olan m-RNA aktivitesinde artışlar meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir. Fakat özellikle GST miktarındaki artışın, GST-m-RNA artışına paralel olmaması, yüksek dozlarda uygulanan AFB<sub>1</sub>'in RNA-polimeraz-II enzimi üzerine olan toksik etkisini akla getirmektedir (Harris ve ark 1998).

AFB<sub>1</sub>'in kromozomlarda meydana getirdiği hasarlar, doğal olarak genetik değişimlere (mutajenik etki) de neden olabilmektedir. Nitekim, Albertini ve ark (1988), AFB<sub>1</sub>'in *in vitro* ortamda domuzların beyin tubulinlerinin organizasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini, bu durumun da AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu anöploidinin bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Farelerde yapılan bir çalışmada ise (Kaplanski ve ark 1997), AFB<sub>1</sub>'in plasenta yoluyla yavrulara geçebildiği ve minisatellit değişimine neden olduğu gösterilmiştir. Dietert ve ark (1985)'da AFB<sub>1</sub>'e maruz kalan kanatlı embriyolarının kan hücrelerinin homolog kromozomları arasındaki parça değişiminin kontrol grubuna nazaran 5 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

#### **2.1.4. Yemlerde ve hayvansal ürünlerde aflatoksinler**

Günümüzde, hızla gelişen kanatlı sektöründe sağlanan genetik ilerlemeler sonucunda yüksek et ve yumurta verimine sahip olan ırkların geliştirilmesi mümkün olmuştur. Bu yüksek verim düzeylerine sahip olan hayvanların rasyonlarının hazırlanmasında küflerin de fazla ürediği, yüksek yağ ve protein oranlarına sahip olan yem hammaddeleri kullanılmaktadır. Aynı zamanda yüksek oranda yem tüketimi de söz konusu olduğundan, düşük miktarlarda toksin içeren yemler bile önemli problemlere neden olabilmektedir. Ayrıca düşük dozlarda alınan aflatoksinlerin hayvanlarda iştahsızlık, halsizlik, zayıflama ve verim düşüklüğü gibi spesifik olmayan semptomlara neden olması da sorunun uzun süre gizli bir şekilde seyretmesine neden olabilmektedir (Özpinar ve ark 1988, Glavitis ve Salyi 1998).

Hayvanlardaki aflatoksikozis önemli sağlık problemlerine sebep olmasının yanı sıra büyük ölçüde verim kayıplarını da beraberinde getirmekte ve bu da önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Hafez ve ark 1982). Ayrıca hayvan yemlerinde bulunan

aflatoksinler, belirli oranlarda insan gıdası olarak kullanılan hayvansal ürünlere de geçmekte ve halk sağlığını da tehdit edebilmektedir. Zira aflatoksinler bilinen en önemli hepatokarsinojenlerdendir (Eser ve ark 1978, Hamilton 1982).

FAO/WHO/Unicef komitesinin Ağustos 1966 tarihli genelgesiyle besinlerdeki aflatoksin düzeyi 30 µg/kg (0,03 ppm = 30 ppb) olarak belirlenmiş (Güray ve Vural 1968) olmakla birlikte; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) ise bu sınırı 20 ppb'ye düşürmüştür. Ülkemizde ise 16 Kasım 1997 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan tebliğe göre yumurtacı tavuk yemleri için müsaade edilen total aflatoksin üst sınırı 20 ppb, AFB<sub>1</sub> üst sınırı ise 10 ppb olarak belirlenmiştir (Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Tebliği 1997).

Ülkemizde üretilen hayvan yemlerinin aflatoksin düzeylerinin belirlenmesine yönelik olan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Kaya (1982), 106 süt ineği yemi örneğinin 21'inde (%19,6) 0,0125 ppm düzeyinde total AF tespit etmiş iken; Özpınar ve ark (1988), Marmara bölgesindeki 15 yem fabrikasından topladıkları 74 adet kanatlı karma yemi ve yem hammaddesi örneğinin %44'ünde 0,2 ile 30,4 ppb arasında değişen AFB<sub>1</sub> düzeyleri tespit etmişlerdir. Çalışmada tespit edilen en yüksek AFB<sub>1</sub> düzeyi ise (30,4 ppb) ise bir yumurta tavuğu yemi örneğine aittir. Elazığ yöresinden temin edilen yem hammaddeleri ile karma yemler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise (Şahin ve Sarı 1996) üretim-yedirme-depolama zinciri göz önüne alındığında en büyük sorunun depolama aşamasında ortaya çıktığı, bu aşamada üreyen mantar türleri arasında ise %65,62 ile *Aspergillus* türlerinin birinci sırayı aldığı belirlenmiştir.

Her ne kadar yemler ve yem hammaddelerinde yapılan çalışmalarda elde edilen aflatoksin düzeyleri nispeten düşük bulunmuş olsa da, kontaminasyonun yem üretimi-depolama ve yedirme zincirinin her noktasında olabildiği ve bu durumun da uzun vadede ciddi sorunlara neden olabileceği vurgulanmaktadır (Şahin ve Sarı 1996). Ayrıca yemlerle alınan aflatoksinler değişik oranlarda hayvansal ürünlere de geçebilmektedir. Bu oran yumurta için 1/2200 olarak bildirilirken (Hamilton 1982), Ağaçdelen ve Acet (1993) bir hafta süresince günde 500 µg/gün/tavuk dozunda AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında, AFB<sub>1</sub>'li yem tüketimi sona erdikten sonraki 3-7. günler arasında 0,013 – 0,177 ng/gr/yumurta miktarında AFB<sub>1</sub> tespit ettiklerini bildirmektedirler. Tuncer (1987) ise 3 örnekte 120 ng/yumurta miktarında total AF tespit etmiştir. Yapılan bir başka çalışmada

(Aldemir 1993) ise günde 500 µg AFB<sub>1</sub> tüketen tavukların karaciğer, böbrek, kırmızı ve beyaz kaslarında uygulama sonrası 4. güne kadar ölçülebilir düzeyde (>0,01 ppb) AFB<sub>1</sub> tespit edilmiştir. Jacobson ve Wiseman (1974) ise 100 ve 400 ppb düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri yumurtacı tavukların yumurtalarında 0,2-0,3 ppb düzeyinde AFB<sub>1</sub> tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada (Jacobson ve Wiseman 1974) 100 ppb AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 10. günde 9 ng/yumurta miktarında AFB<sub>1</sub>'e rastlanılmıştır. 18 adet yumurtacı tavuk üzerinde yapılan bir başka çalışmada (Trucksess ve ark 1983), 7 gün süre ile 8000 ppb düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların gerek yumurtalarında ve gerekse de tüketime sunulan yenilebilir dokularında hem AFB<sub>1</sub> ve hem de aflatoksinol (Ro) miktarları belirlenmiştir. Aynı çalışmada (Trucksess ve ark 1983), en yüksek AFB<sub>1</sub> ve Ro düzeyleri karaciğer ve yumurtada tespit edilmiştir. Yumurtada tespit edilen en yüksek AFB<sub>1</sub> miktarı (0,2 ng/yumurta) toksinli yem tüketiminin 4-5. günlerinde saptanmıştır. Sudhakar (1992) ise 600 ppb (µg/kg) düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 5 ng/gr yumurta miktarında AFB<sub>1</sub> tespit ettiğini bildirirken, Oliveira ve ark (2000) 500 µg/kg AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarının 6 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> içerdiğini ileri sürmektedirler. Qureshi ve ark (1998) da 14 gün boyunca 10 µg/kg AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri broyler anaçların yumurtalarında 7. gün sonunda 0,15-0,48 ng/yumurta miktarında AFB<sub>1</sub>, 0,22-0,51 ng/yumurta miktarında da aflatoksinol belirlemişlerdir.

Yukarıdaki çalışma sonuçları dikkate alınarak yapılacak olan bir hesaplama yemle alınan aflatoksinin ortalama olarak 1/2000 – 1/2500 oranında yumurtaya geçtiğini göstermektedir (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a). Ülkemiz için karma yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyinin 20 ppb olduğu dikkate alındığında, günde 130 gr yem tüketen ve gün aşırı yumurtlayan bir yumurtacı tavuğun yumurtasına geçebilecek total aflatoksin miktarının yaklaşık olarak 2,6 ng olduğu hesaplanabilir. Jelinek ve ark (1985), tavuk embriyotoksisite testi-I (Chicken Embryotoxicity Screening Test-I, CHEST-I) ile tavuk embriyoları için total AF embriyotoksik doz sınırını 0,3-30 ng/yumurta, teratojenite doz sınırını ise 3-30 ng/yumurta olarak bildirmektedirler. Bu durumda yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri bile kanatlı sektörü için büyük bir risk faktörü oluşturabilir. Zira, Jelinek ve ark'nın (1985) bulguları, embriyotoksik doz sınırındaki AF'nin %33 oranında mortaliteye neden olurken, teratojenik doz sınırındaki AF'nin %12 oranında kalp ve %4 oranında da vücut duvarının kapanmaması gibi yapısal anomalilere neden olduğunu göstermektedir. Tablo 2.1'de, söz

konusu çalışmalar ile bu çalışmalarda hayvansal doku ve gıdalarda tespit edilen aflatoksin rezidüleri verilmiştir.

**Tablo 2.1: Çeşitli araştırmacıların hayvansal doku ve gıdalarda tespit ettikleri aflatoksin (AF) değerleri.**

Araştırmacı	Hayvan Türü	Süre	Doz	Hayvansal Doku ve Gıdada Tespit Edilen Rezidü
Jacobsen ve Wiseman, 1974	Tavuk	10.gün	100 ppb AFB <sub>1</sub>	9 ng/yumurta AFB <sub>1</sub>
Trucksess ve ark, 1983	Tavuk	4-5.günler arası	8000 ppb AFB <sub>1</sub>	0,2 ng/yumurta AFB <sub>1</sub>
Tuncer, 1987	Tavuk	-	Saha taraması	120 ng/yumurta AF
Ağaçdelen ve Acet, 1993	Tavuk	3-7.günler arası	500 µg/gün/tavuk AFB <sub>1</sub>	0,013-0,177 ng/g/yumurta AFB <sub>1</sub>
Aldemir (1993)	Tavuk	4.gün	500 µg/gün AFB <sub>1</sub>	Karaciğer, böbrek ve kas, >0,01ppb AFB <sub>1</sub>
Sudhakar, 1992	Tavuk	3.hafta	600 ppb AFB <sub>1</sub>	5 ng/g yumurta AFB <sub>1</sub>
Qureshi ve ark, 1998	Tavuk	7.gün	10 ppb AFB <sub>1</sub>	0,15-0,48 ng/yumurta AFB <sub>1</sub>
Oliveira ve ark, 2000	Tavuk	8.hafta	500 ppb AFB <sub>1</sub>	6 ng/yumurta AFB <sub>1</sub>
Stubblefield ve ark, 1983	Sütçü inek	3. gün	0,35 mg AFB <sub>1</sub> /kg canlı ağır.	Böbrek 57,9 ng/g AF Meme 25,1 ng/g AF Karaciğer 13,2 ng/g AF
Harvey ve ark, 1991	Sütçü inek	7. gün	100 ve 200 ppb AF	0,91 ve 1,85 µg/L AFM <sub>1</sub>

Yemlerle alınan aflatoksinler ve türevleri süte de geçebilmektedir. Kaya (1982) 106 süt ineği yemi örneği ve 38 çiğ süt örneği üzerinde yaptığı bir çalışmada, yemlerin %19,6'sında ölçülebilir düzeylerde aflatoksin, sütlerin ise %5,7'sinde aflatoksin metaboliti olan AFM<sub>1</sub> tespit ettiğini bildirmektedir. Stubblefield ve ark (1983) ise Holstein ırkı sığırlar üzerinde yapmış oldukları deneysel bir çalışmada 3 gün süreyle 0,35 mg AFB<sub>1</sub>/kg canlı ağırlık dozunda AFB<sub>1</sub>'li yem ile besledikleri ineğin son uygulamadan 24 saat sonra alınan beyin, kalp, bağırsak, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak, meme dokusu, iskelet kası dokusu, meme lenf yumrusu, dil dokusu örnekleri ile süt, safra salgısı, kan, dışkı ve rumen içeriğinde değişik düzeylerde hem AFB<sub>1</sub> ve hem de AFM<sub>1</sub> tespit etmişlerdir. Söz konusu araştırmada en yüksek total AF düzeyleri böbrek, meme ve karaciğer dokularında ve sırasıyla 57,9, 25,1 ve 13,2 ng/g olarak bulunmuştur. Sütçü sığırlar üzerinde yapılan bir başka deneysel çalışmada (Harvey ve ark 1991), 7 gün süre ile 100 ve 200 µg/kg aflatoksin

içeren yemle beslenen sığırların sütlerinde sırasıyla 0,91 µg/L ve 1,85 µg/L düzeyinde AFM<sub>1</sub> tespit edilmiştir.

Yönetmeliklerle belirlenen total AF ve AFB<sub>1</sub> düzeyleri dikkate alındığında sözü edilen ve insanoğlunun temel gıda maddelerini oluşturan hayvansal gıdalarda tespit edilmiş olan AF düzeyleri insan sağlığı açısından kısa vadede önemli sorunlara yol açmayabilir. Ancak özellikle anaç tavuk yemlerinden dömlü tavuk yumurtalarına geçen AF'ler ve özellikle de AFB<sub>1</sub>, kuluçka randımanında neden olduğu kayıplar yanında, immün sistem organlarının embriyonal gelişmeleri esnasında yol açtığı bozukluklarla tavukçuluk sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Halk sağlığı açısından önemle üzerinde durulması gereken nokta ise tarımsal gıdalardaki AF düzeyleridir. Nitekim, Eser ve ark (1978)'nin 292 bulgur örneği üzerinde yaptıkları çalışma sonuçları, örneklerin %23'ünde 20 ppb'nin, %9'unda ise 100 ppb'nin üzerinde total AF bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bulgur örneklerinin Doğu, Güney ve Orta Anadolu bölgelerinden toplandığı ve söz konusu bölgelerimizdeki karaciğer kanseri insidensinin Trakya bölgesi ve İstanbul çevresine nazaran 3 kat daha fazla olduğu gerçeği göz önüne alındığında söz konusu araştırma bulguları oldukça dikkat çekicidir. Nitekim, AFB<sub>1</sub> bilinen güçlü hepatokarsinojenlerin en önemlisidir (Sengstag 1997).

### **2.1.5. Hayvanlarda aflatoksikozis**

Aflatoksinler hem halk sağlığı ve hem de hayvan sağlığı açısından oldukça önemlidirler. Aflatoksinlere duyarlılıkları bakımından hayvan türleri arasında belirgin farklılıklar söz konusudur. En duyarlı türler arasında ördek, tavşan, hindi, alabalık, kedi ve köpekler başta gelirken; orta derecede duyarlı türler arasında at, sığır, koyun, keçi, kobay, rat, bıldırcın ve Leghorn ırkı tavuklar bulunmaktadır (Hatch 1988). Aflatoksinlere dirençli türler olarak ise fare ve maymunlar gösterilmektedir (Çetin 1990).

Evcil hayvan türlerinden aflatoksine en duyarlı olanı ördek palazlarıdır. Çünkü bu türün karaciğer hücrelerindeki mikrozomal MFO düzeyleri, diğer türlerdekinden oldukça yüksektir (Reddy 1992). Bunun dışında piliç, hindi (Hatch 1988), bıldırcın (Dashek ve ark 1983), tavşan (Sahoo ve ark 1993a, Sahoo ve ark 1993b, Krishna ve ark 1991), alabalık (Bilgiç ve Türkmen 1993), sığır (Van Halderen ve ark 1989), koyun (Suliman ve ark 1987), keçi (Miller ve ark 1984) gibi ekonomik önemi olan çiftlik hayvanlarının yanı sıra

rat (Rogers ve Newberne 1971), fare (Tuzcu 1999), maymun (Rao ve Gehring 1971, Shank ve ark 1971) gibi laboratuvar hayvanları da duyarlı türler arasındadır. Tablo 2.2’de bazı hayvan türleri için AFB<sub>1</sub>’in hayvanların %50’sini öldüren doz (ÖD<sub>50</sub>) değerleri verilmiştir (Hatch 1988).

**Tablo 2.2:** Farklı hayvan türlerinde AFB<sub>1</sub>’in ÖD<sub>50</sub> değerleri.

Hayvan Türü	ÖD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hayvan Türü	ÖD <sub>50</sub> (mg/kg)
Ördek palazı (1 günlük)	0,3-0,6	Sığır (buzağı)	0,5-2
Gökkuşluğu Alabalığı, 100 g	0,5-1	Koyun	2
Tavşan	0,3-0,5	Keçi	2
Köpek	0,5-1	Maymun	2,2-7,8
Tavuk (New Hampshire) ergin	2	Rat (sütten yeni kesilmiş)	5,5
Tavuk (Leghorn) 16 haftalık	6,5-16,5	Fare (ergin)	9

Aflatoksikozis’in neden olduğu klinik semptomların, otopsi bulgularının, biyokimyasal ve histopatolojik bulguların toplanmasında deneysel çalışma sonuçları yanında doğal aflatoksikozis vakalarından elde edilen bulguların da önemli katkıları olmuştur. İngiltere’de 1960 yılında çıkan ve aflatoksinlerin ilk kez gündeme gelmesine yol açan, 100.000 hindinin ölümüyle sonuçlanan salgının yanı sıra, yumurtacı tavuklarda (Gupta ve ark 1985, Dafalla ve ark 1987a, Raina ve Singh 1991), koyunlarda (Suliman ve ark 1987), sütçü sığırlarda (Van Halderen ve ark 1989), tavşanlarda (Krishna ve ark 1991) ve broyler civcivlerde (Okeye ve ark 1988) sporadik vakalar da bildirilmiştir. Bu vakalar her ne kadar küçük işletmelerde ve belirli bir bölgede sınırlı olarak gözlenmiş olsa da, aflatoksikozis olaylarının dünyanın hemen her yerinde ve çiftlik hayvanı olarak yetiştirilen her hayvan türünde ortaya çıkabildiğini göstermesi bakımından önemlidirler. Söz konusu vakalarda hayvanların tükettikleri yemlerin hepsinde de değişik düzeylerde aflatoksin tespit edilmiş, gerek histopatolojik (Krishna ve ark 1991, Van Halderen ve ark 1989) ve gerekse de biyokimyasal analizler (Dafalla ve ark 1987a, Suliman ve ark 1987) sonucunda deneysel çalışma sonuçlarına uygun bulgular elde edilmiştir.

Aflatoksikozis olaylarında gözlenen klinik bulgular çok spesifik olmamakla birlikte genel olarak yem tüketiminin azalması, canlı ağırlık kaybı, halsizlik ve ishal, ilk

olarak göze çarpan semptomlardır (Rao ve Gehring 1971, Miller ve ark 1984, Suliman ve ark 1987, Van Halderen ve ark 1989, Sahoo ve ark 1993b, Ouz ve Kurtoğlu 2000, Ouz ve ark 2000b). Bununla birlikte memelilerde kusma (Rao ve Gehring 1971), sarılık (Rao ve Gehring 1971, Miller ve ark 1984, Krishna ve ark 1991, Sahoo ve ark 1993b), öksürük, burun akıntısı ve burun kanaması ile kansızlık gibi belirtiler gözlenebildiği gibi gebe hayvanlarda yavru atmalar da söz konusudur (Hatch 1988). Akut ve subakut formlarda gözlenen bu belirtilerin yanında, daha yaygın ve daha önemli sonuçlara yol açan kronik olaylarda yem tüketiminin azalması, yemden yararlanma oranının azalması yanında canlı ağırlık kazancında düşümlere ve sonuçta da önemli oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kanatlılarda ise yine akut ve subakut toksikasyon formunda iştahsızlık, halsizlik, kanat ve bacaklarda felç, canlı ağırlık artışında azalmanın yanı sıra yumurta veriminde, yumurta ağırlığında ve yumurta kabuğu kalitesinde önemli düşümler söz konusudur (Gupta ve ark 1985, Washburn ve ark 1985, Huff ve ark 1986, Fernandez ve ark 1994, Jindal ve ark 1994).

Kanatlılarda ortaya çıkan aflatoksikozis olaylarında, karaciğerin büyümesi, soluklaşp kenarlarının kütleşmesi (Krishna ve ark 1991, Oğuz 1997, Tuzcu 1999), safra kesesinin dolgunlaşması (Krishna ve ark 1991, Tuzcu 1999), böbreklerin büyümüş ve ödemli olmaları (Van Halderen ve ark 1989, Bilgiç ve Yeşildere 1992, Tuzcu 1999) ve dalağın büyümesi (Balachandran ve Ramakrishnan 1987, Sahoo ve ark 1993b, Oğuz 1997) ile birlikte bağırsakların koyu bir içerikle dolu olması (Tuzcu 1999) dikkat çekici otopsi bulgularıdır.

Önemli histopatolojik bulgular ise hepatositlerde dejenerasyon (Dashek ve ark 1983, Tuzcu 1999) ve yağlanma (Shank ve ark 1971, Dashek ve ark 1983, Yakışık 1992, Tuzcu 1999), safra kanalı epitel hücrelerinin proliferasyonu (Dashek ve ark 1983, Okoye ve ark 1988, Yakışık 1992), böbrek tubulus epitellerinin dejenerasyonu ve nekrozunun yanı sıra glomeruluslarda büyüme (Bilgiç ve Yeşildere 1992, Tuzcu 1999), dalakta kırmızı pulpanın nisbi olarak genişlemesi (Sahoo ve ark 1993b) ile retikulum hücrelerinin hiperplazisinin yanında (Balachandran ve Ramakrishnan 1987), lenf folikülleri (Dafalla ve ark 1987b) ve periarteriyoler lenfoid kılıftaki lenfositlerde azalma (Tuzcu 1999), beyinde ödem (Shank ve ark 1971) ve nöronların dejenerasyonudur (Tuzcu 1999). Ayrıca, tavuklarda yukarıdaki bulgulara ek olarak bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinde lenfosit azalması, interfoliküler epitelde dökülme (Okoye ve ark 1988) ve fibrozis (Raina ve Singh

1991) yanında, timus medullasındaki timositlerde azalma (Okoye ve ark 1988, Espada ve ark 1992) gözlenmektedir. Timus ve bursa Fabricii'deki bu değişiklikler, anılan organların nisbi ağırlıklarındaki düşüşle birlikte ortaya çıktığından (Oğuz 1997), söz konusu bulgular aflatoksinin kanatlılarda neden olduğu immünoşüpresyonun açıklamasında önemli bir ipucu olarak kabul edilmektedir (Kubena ve ark 1990, Espada ve ark 1992). Kanatlılarda dalak, timus ve bursa Fabricii'de meydana gelen hasarlar, hayvanların çevresel hastalık etkenlerine karşı daha duyarlı hale gelmelerine neden olmakta, böyle hayvanlar da enfeksiyonlara daha kolay yakalanabilmektedirler. Nitekim, Giambone ve ark (1985a,b,c)'nın hindi palazları ve broyler piliçler üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda düşük dozlardaki aflatoksinin bile hücrel immüniteyi baskıladığı tespit edilmiştir. Miller ve ark (1984) ise keçilerde oluşturdukları deneysel aflatoksikozis süresince hayvanların kendi mikrofloralarına karşı bile duyarlı hale geldiklerini; deney grubunu oluşturan hayvanlarda gözlenen pnömoni ve rhinitis olaylarının da buna bağlı olarak şekillenmiş olabileceğini bildirmişlerdir. Rajan ve ark (1989) ise aflatoksikozisli domuzların uyuz hastalığına daha kolay yakalandıklarını tespit etmişler ve bu durumun, aflatoksinlerin immün sistemi baskılamasının sonucu olarak ortaya çıktığını ileri sürmüşlerdir.

Aflatoksikozisli hayvanlarda kanın biyokimyasal özelliklerinde de klinik, otopsi ve histopatolojik bulguları destekleyen değişiklikler meydana gelmektedir. Hastalığın erken evrelerinde hepatosit enzimlerinden olan ALP (Rao ve Gehring 1971, Chattopadhyay ve ark 1985, Lindemann ve ark 1993, Jindal ve ark 1994), ALT (Rao ve Gehring 1971, Sahoo ve ark 1993a), AST (Rao ve Gehring 1971, Dalvi ve Mc Gowan 1984, Suliman ve ark 1987, Balachandran ve Ramorkrishnan 1987, Lindemann ve ark 1993, Sahoo ve ark 1993a, Jindal ve ark 1994), ICD (Rao ve Gehring 1971), GGT (Sharlin ve ark 1981, Suliman ve ark 1987, Kubena ve ark 1990, Lindemann ve ark 1993), GDH (Dafalla ve ark 1987a) ve SDH (Dafalla ve ark 1987b) enzimlerinin serum düzeylerinin belirgin bir şekilde yükselmesi, şiddetli karaciğer hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca total protein (Chattopadhyay ve ark 1985, Dafalla ve ark 1987a, Dafalla ve ark 1987b, Mert ve ark 1987, Suliman ve ark 1987, Glahn ve ark 1990, Lindemann ve ark 1993, Sahoo ve ark 1993a, Jindal ve ark 1994, Keçeci ve ark 1998), albumin (Sharlin ve ark 1981, Miller ve ark 1984, Huff ve ark 1986, Kubena ve ark 1990, Lindemann ve ark 1993, Keçeci ve ark 1998, Oğuz ve ark 2000a) ve globulin (Miller ve ark 1984) seviyelerinde oluşan belirgin düşüşler de önemli derecedeki karaciğer tahribatının bir göstergesi olup; serum antikor (Giambone ve ark 1978, Jonauskienė ve ark



1998) seviyelerindeki düşüşlerin de bu durumla ilgili olabileceği öne sürülmektedir. Bunun yanında, hepatositlerde aflatoksinlerin neden olduğu harabiyete bağlı olarak bilirubin metabolize edilemediğinden, serum bilirubin düzeylerinde de artışlar oluşmaktadır (Rao ve Gehring 1971, Suliman ve ark 1987).

Aflatoksinlerin etkilediği bir diğer organ da böbreklerdir. Serum ürik asit (Mert ve ark 1987, Oğuz ve ark 2000a), kalsiyum (Dafalla ve ark 1987b, Glahn ve ark 1991, Fernandez ve ark 1994, Jindal ve ark 1994) ve fosfor (Fernandez ve ark 1994, Jindal ve ark 1994) seviyelerindeki düşüşlere karşın, serum kreatin (Chattopadhyay ve ark 1985), sodyum (Dafalla ve ark 1987a) ve potasyum (Dafalla ve ark 1987a, Dafalla ve ark 1987b) düzeylerindeki artışlar aflatoksinlerin böbrekler üzerindeki toksik etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kalsiyum ve fosfor seviyelerindeki düşüşlerde bağırsaklardaki emilim yetersizliğinin de etkili olabileceği bildirilmekte (Dafalla ve ark 1987b, Jindal ve ark 1994) ve bu durumun yumurta tavuklarında yumurta kabuğu kalitesini düşürdüğü kabul edilmektedir (Fernandez ve ark 1994).

#### **2.1.6. Aflatoksinlerin immünotoksik etkileri**

Farklı mikotoksin türlerinin önemli immünosupresif etkilerinin olduğu, çeşitli laboratuvar hayvanlarının (Reddy ve ark 1987, Reddy ve Sharma 1989, Cukrova ve ark 1991) yanı sıra yumurtacı tavuklar (Thaxton ve ark 1974, Giambone ve ark 1978), broyler tavuklar (Campbell ve ark 1983, Steward ve ark 1985), genç horozlar (Mohiuddin ve ark 1986), ördek palazları (Slowik ve ark 1985) ve hindilerde (Batra ve ark 1991) yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Bir *fusarium* mikotoksini olan T-2 (trichotecene) toksininin (Gerberick ve Sorenson 1983, Sorenson ve ark 1986, Holt ve De Loach 1988, Corrier ve Norman 1988, Dugyala ve ark 1994) yanı sıra okratoksin A (Campbell ve ark 1983, Boorman ve ark 1984, Luster ve ark 1987, Singh ve ark 1990) ve patulin (Sorenson ve ark 1986) gibi mikotoksinlerin immünosupresif etkileri ortaya konulmakla beraber, asıl çalışmalar aflatoksinler ve bunun en toksik alt grubu olarak kabul edilen aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) üzerinde yoğunlaşmıştır (Oswald ve Comera 1998). Zira bu aflatoksin türü doğada en fazla rastlanan mikotoksindir (Leeson 1995).

Aflatoksinlerin ve özellikle de AFB<sub>1</sub>'in immüno-supresif etkisinin mekanizması hakkında farklı görüşler ileri sürülmüştür. Komplemant aktivitesinde (Campbell ve ark 1983, Steward ve ark 1985) ve serum protein düzeylerinde meydana gelen belirgin düşüşlerin (Campbell ve ark 1983, Sorenson ve ark 1986, Reddy ve ark 1987, Ghosh ve ark 1990, Jonauskiene ve ark 1998) nedeni olarak karaciğer hasarı gösterilmektedir. Ancak aflatoksinlerin, direkt immüno-supresif etkilerinin hücresele bağışıklık sistemi üzerinde daha belirgin olduğu kabul edilmektedir (Mc Loughlin ve ark 1984, Corrier 1991). Özellikle düşük dozlarda toksine uzun sürelerle maruz kalınması sonucu ortaya çıkan bu durumdan (Giambone ve ark 1985b,c, Corrier 1991) makrofajların fagositik ve mikrobisidal etkilerinde meydana gelen önemli düşüşler sorumlu tutulmaktadır (Mohapatra ve ark 1985, Mohiuddin ve ark 1986, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a, Jakab ve ark 1994, Çelik ve ark 1996, Dugyala ve Sharma 1996, Cusumano ve ark 1996). Ayrıca kemik iliği (Mohiuddin ve ark 1986, Cukrova ve ark 1991, Dugyala ve ark 1994), timus ve bursa Fabricii (Thaxton ve ark 1974, Campbell ve ark 1983, Slowik ve ark 1985, Ram ve ark 1988, Kıran ve ark 1998) gibi merkezi lenfoid organlarda meydana gelen hasarlar ile buna bağlı olarak ortaya çıkan lenfosit popülasyonlarındaki azalmalar (Campbell ve ark 1983, Mohiuddin ve ark 1986, Ghosh ve ark 1991, Keçeci ve ark 1995) da aflatoksinlerin immüno-supresif etkilerinin olası nedenleri arasında sayılabilir. Total lenfosit popülasyonlarındaki azalmaların özellikle T-lenfositlerde meydana gelen düşüşlerden kaynaklanması (Mc Loughlin ve ark 1984, Reddy ve ark 1987, Reddy ve Sharma 1989, Ghosh ve ark 1990, Ghosh ve ark 1991, Raisuddin ve ark 1993, Çelik ve ark 2000b), aflatoksinlerin hücresele bağışıklık sistemi üzerindeki baskılayıcı etkilerini destekleyen önemli bulgulardır.

AFB<sub>1</sub>'in immüno-supressif etkisinin, aflatoksikozisli hayvanlarda protein sentezinin aksaması ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir. AFB<sub>1</sub>'in karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşan metabolitleri, DNA ve RNA'ya bağlanarak DNA-bağımlı RNA polimeraz enziminin aktivitesini baskılamakta, böylece RNA sentezi ve sonuçta da protein sentezinin aksaması sonucu lenfoid sistem hücrelerinin çoğalıp farklılaşmaları olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu olayda immün sistem hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan sitokinlerin sentezinin baskılanması da önemlidir (Dugyala ve Sharma 1996).

AFB<sub>1</sub>'in immüno-supressif etkilerinin saha şartlarında neden olduğu sorunlar, yapılan aşılama çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Özer ve ark 1989, Batra ve ark 1991, Gabal ve Azzam 1998). Marek hastalığı (Batra ve ark 1991), New Castle (Özer ve ark

1989, Gabal ve Azzam 1998), infeksiyöz bronşitis, kanatlı kolerası (Hegazy ve ark 1991) ve infeksiyöz bursal hastalık (Azzam ve Gabal 1997) etkenlerine karşı aşılanan hayvanların, aflatoksinli yemlerle beslenmeleri durumunda daha düşük düzeyde antikor titresine sahip oldukları gözlenmiştir. Özellikle aşılanmanın aflatoksinli yemin alındığı döneme rastlaması durumunda, aşı yararlılığının daha da azaldığı ve akut aflatoksikozis oluşturmayacak düzeyde alınan toksinin dahi humoral immüniteyi baskılayabileceği (Özer ve ark 1989) ve böyle sürülerde ortaya çıkan enfeksiyonlarda aşılanan hayvanlardan da ölenlerin bulunduğu bildirilmektedir (Gabal ve Azzam 1998).

Memeli hayvanlarda yapılan çalışma sonuçları annenin yemle aldığı aflatoksinin belirli bir oranının plasenta yolu ile yavruya geçebildiği ve yavrunun immün sisteminin embriyonal gelişimini baskıladığı ileri sürülmektedir (Oswald ve Comera 1998). Civcivlerde olduğu gibi memelilerde de yeni doğan yavrunun immün sistem organları normal gelişimlerini sağlamadıklarından, aşılamalardan başarılı sonuçlar alınmamakta ve böylece düzenli olarak aşılanan sürülerde bile salgın hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Oswald ve Comera 1998).

Yapılan çalışmalar (Gerberick ve Sorenson 1983, Sorenson ve ark 1986) çoğunlukla sistemik immünite üzerinde yoğunlaşmış olmakla birlikte; mikotoksinler, giriş yollarına bağlı olarak sindirim kanalının lenfoid dokusu (Gut Associated Lymphoid Tissue- GALT) ile solunum sisteminin bronş ilişkili lenfoid doku (Bronchus Associated Lymphoid Tissue-BALT)'larında da belirgin yetmezliklere neden olması kaçınılmazdır. Nitekim bazı araştırmacılar tahıl yükleme ve boşaltma işlerinde çalışan insanların BALT dokusunda oluşan değişikliklere dikkat çekmişlerdir (Gerberick ve Sorenson 1983, Sorenson ve ark 1986, Oswald ve Comera 1998).

#### **2.1.7. Aflatoksinlerin embriyotoksik etkileri**

Gerek memeli hayvanlar ve gerekse de kanatlılarda yapılan çalışma sonuçları aflatoksinlerin önemli derecede embriyotoksik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır (Elis ve Dipaolo 1967, Cilievici ve ark 1980, Geissler ve Faustman 1988, Mayura ve ark 1998, Çelik ve ark 2000a). Ratlara gebeliğin erken dönemlerinde verilen AFB<sub>1</sub>'in büyük oranda embriyonal resorbsiyona neden olduğu, yaşayabilen fötüslerde de gelişme geriliklerinin meydana geldiği bildirilmektedir (Mayura ve ark 1998). Rat embriyo kültür ortamına ilave edilen AFB<sub>1</sub> ise, embriyoda protein ve DNA sentezini önemli oranda inhibe

etmekte ve sonuç olarak özellikle nöral tüpte önemli malformasyonlara neden olmaktadır (Geissler ve Faustman 1988). Yine hamsterlerde gebelik döneminde alınan AFB<sub>1</sub>, şiddeti erken dönemlerde daha da artan fetal malformasyonlara neden olmaktadır (Elis ve Dipaolo 1967).

Kanatlılarda ise memelilerdeki gibi fetal-maternal ilişki olmamakla birlikte, yemlerle alınan aflatoksinlerin belirli oranlarda yumurtaya da geçmesi nedeniyle embriyonal gelişmede ciddi problemler ortaya çıkmaktadır. Yumurtaya geçen AFB<sub>1</sub>, özellikle erken dönemlerde yüksek oranlarda embriyonal ölümlere yol açmakta; buna karşın yaşayabilen embriyolarda da gelişme geriliği ve çeşitli anomalilerle birlikte kabuğu kırıp çıkabilen civciv sayısı da önemli oranda düşmektedir (Verret ve ark 1964, Bassir ve Adekunle 1970, Stoloff ve ark 1972, Cilievici ve ark 1980, Çelik ve ark 2000a). Çelik ve ark (2000a) inkübasyon başlangıcında yumurtaya verilen 100 ng/yumurta dozundaki saf AFB<sub>1</sub>'in %98 oranında erken embriyonik ölümlere yol açtığını bildirmişler, Cilievici ve ark (1980) ise inkübasyonun 96. saatinde 0,01 ve 0,002 ppm olmak üzere iki farklı dozda uyguladıkları AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu embriyonik mortalitelerin, sırasıyla %35 ve %26 olduğunu tespit etmişlerdir. Cilievici ve ark (1980)'nin çalışmasında 0,01 ve 0,002 ppm dozunda AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda spina bifida ve anoftalmus gibi yapısal anomalilere ise sırasıyla %35 ve %13,3 oranında rastlanmıştır.

Embriyonal dönemde maruz kalınan AFB<sub>1</sub>, merkezi bağışıklık sistemi organları olan timus ve bursa Fabricii'nin embriyonal gelişmelerinde önemli hasarlara neden olduğundan (Çelik ve ark 2000a) doğum sonrası ya da kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde canlılığın enfeksiyonlara karşı daha hassas bir duruma gelmesine yol açmaktadır. Neldon-Ortiz ve Qureshi (1992b), embriyonal dönemde AFB<sub>1</sub>'e maruz bırakılan ve yumurtadan çıkarak 4 haftalık döneme ulaşılabilen piliçlerde peritoneal makrofajların sayısında ve fagositik aktivitelerinde önemli düşüşler tespit etmişlerdir. Dietert ve ark (1985) ise embriyonal dönemde AFB<sub>1</sub>'e maruz kalan civcivlerin doku reddi ve kutanöz bazofil reaksiyonları gibi hücrel immünite fonksiyonlarında önemli düşüşler tespit ettiklerinden, dömlü tavuk yumurtasında bulunan AFB<sub>1</sub>'in kuluçka sonrası dönemde belirgin etkilerinin ortaya çıkabileceğini ileri sürmüşlerdir. Qureshi ve ark (1998) ise, 10 ppm total AF içeren yemle beslenen broyler anaçlardan elde edilen dömlü yumurtalardan çıkan civcivlerin peritoneal makrofaj sayılarında belirgin düşüşlerin oluşmadığını; ancak bu hücrelerin fagositoz kapasitelerinin önemli oranda düşük olduğunu saptamışlardır.

## 2.2. Kanatlılarda Timusun Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi

### 2.2.1 Timusun histolojik yapısı

Kanatlı ve memelilerde timus, T-lenfositlerinin olgunlaştıkları primer bir lenfoid organdır. Kanatlılarda timus, boyunun her iki tarafında, sulcus jugularis boyunca aralıklarla yerleşmiş, oval şekilli yaklaşık 7'şer adet loptan oluşur. Bezin her lobu bağ dokusundan ince bir kapsül ile sarılmış olup, bu kapsül organ içerisine girerek organı tam olmayan lopçuklara ayırır (Hodges 1974).

Lopçuklarda korteks ve medulla olmak üzere iki bölge ayırılır. Medulla bölgesi kortekse nazaran daha az sayıda lenfosit içerdiğinden, rutin boyama işlemleriyle hazırlanan preparatlarda açık renkte görülür. Her iki bölgenin stromasını da retikulum hücreleri oluşturur. Memeli timusunun medullasında sıklıkla rastlanılan konsentrik lamellerden oluşan Hassal cisimciklerine kanatlı timusunun medullasında daha seyrek olarak rastlanmaktadır. Buna karşın, kanatlılarda Hassal cisimciklerinin diffüz tipi olarak nitelendirilen ve retikulum hücrelerinin değişikliğe uğramaları ile şekillenen kistik yapılar gözlenmektedir (Hodges 1974, Hoshimoto ve Sujimora 1976, Sandıkçı ve Çelik 2000).

Timusun korteksinde bulunan lenfositlerin (kortikal timositler) büyük çoğunluğu küçük tip lenfositlerdir. Bununla birlikte kuluçkadan çıkışı takiben ilk 5 hafta boyunca CD4 (+) lenfositlerin (T-helper) korteks ve medullada eşit bir dağılım gösterdiği, 9. haftadan sonra ise bu hücrelerin korteksi terk edip çoğunlukla medullada yerleştikleri bildirilmektedir. CD8 (+) lenfositlerin (T-sitotoksik/süpressör) ise kuluçkadan çıkıştan sonraki gelişim süreci boyunca çoğunlukla kortekste yerleştikleri ileri sürülmektedir (Khan ve ark 1998).

Makrofajlar ise timusta, çoğunlukla korteks ve medulla sınırında yerleşirken; kortekste bulunmayan plazma hücrelerine ise medullada tek tük rastlanılmaktadır (Kelly ve ark 1984).

Kuluçkadan çıkışı takip eden ilk 17 hafta boyunca gelişimini sürdüren timus, ilerleyen haftalarda yavaş yavaş küçülmeye başlar. Dördüncü haftada medullada ortaya çıkan kistik yapılar da bu süre içerisinde artarlar. Onsekizinci haftada ise korteks hemen hemen tamamen ortadan kalkar ve organ bir süre sonra bütünüyle involüte olarak yerinde

küçük lenfoid doku odakları, yağ hücresi toplulukları ve dejenere retikulum hücresi toplulukları kalır (Hodges 1974, Sandıkçı ve Çelik 2000).

### **2.2.2. Timusun embriyonal gelişimi**

Timus taslağı 3. ve 4. yutak ceplerinin endoderminden gelişir (Maskar 1976, Carlson 1981, Kelly ve ark 1984, Latshaw 1987). Bu ceplerin hizasındaki endodermal hücrelerin yutak bölgesine göç etmelerinin ardından, bölgede oluşan ektomezenkimal hücreler, endodermal epitelyal hücre topluluklarını çevrelerler. Oluşan epitelyal taslak içine, komşu kan damarlarının lümenlerinden göç eden lenfoid hücrelerin öncülleri olan iri bazofilik sitoplazmalı hücreler girer ve burada yerleşirler. Epitelyal hücreler, lenfoid hücrelerin öncüllerinin diferansiye olmalarını sağlayacak şekilde organize olarak bir ağ şekillendirirler (Backman 1997). İlerleyen dönemlerde çoğalan hücre kümeleri boğumlanarak loplara şekillenmeye başlar (Maskar 1976). Sandıkçı ve Çelik (2000a) inkübasyonun 7. gününde organ taslağını oluşturan hücreler arasındaki iri-bazofilik hücrelerin sayılarının arttığını, 10. günde küçük lopçukların şekillenmeye başladığını, 13. günde ise korteks-medulla ayırımının yapılabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 13.günde medullada tek tük alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozitivitesi gösteren hücrelere de rastlanmıştır. İnkübasyonun 15-18. günlerinde ise kapsülde ve lopçuklar arası bölgelerde hücresel ve ipliksel unsurlarda artışlar gözlenmiştir. Timusun gelişimi kuluçkadan çıkışı takip eden 9-11.günlerde hemen hemen tamamlanmış durumda olup, ANAE (+) hücrelere korteks-medulla sınırında ve çoğunlukla da medulla tarafında rastlanıldığı bildirilmektedir (Sandıkçı ve Çelik 2000).

### **2.3. Bursa Fabricii'nin Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi**

#### **2.3.1. Bursa Fabricii'nin histolojik yapısı**

17.yüzyılın ilk yarısında Hieronymus Fabricius tarafından tanımlanan organ bu araştırmacının adına izafeten "Bursa Fabricii (Bursa of Fabricius)" olarak isimlendirilmiştir. Kanatlıların kloakasının dorsalinde yer alan bursa Fabricii, asıl kese, boyun ve kanal bölümlerinden oluşmaktadır (Kocaöz ve ark 1997a). Organ lümeni kanal kısmı ile proktodeum'a açılır (Hassa 1955). Histolojik olarak gelişimini tamamlamış olan bursa Fabricii'de içten dışa doğru tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza katmanları ayırtdedir. Organa özgü lenf folikülleri, tunika mukoza katmanının lümene doğru yapmış olduğu boyuna kıvrımlarda (plika) lokalize olmuşlardır. Tunika mukozanın epitelinde

foliküller arası bölgede (İnterfoliküler epitel, IFE) yalancı çok katlı prizmatik epitel ile foliküllerin üzerini örten bölgede bazal membranı bulunmayan, bol miktarda da lenfosit içeren özelleşmiş bir epitel (Folikül İlişkili Epitel, FAE) olmak üzere iki farklı bölge ayırılır (Lupetti ve ark 1990, Olah ve Glick 1992).

Organa ait lenf foliküllerinde korteks ve medulla olmak üzere iki bölge ayırılır. Rutin boyalarla daha koyu gözlenen korteks ile hücreden fakir olması nedeniyle daha açık gözlenen medulla arasında, İFE'nin devamı olan kortiko-medullar sınır hücreleri katmanı (KMSH) dikkati çekmektedir (Dönmez ve Çelik 1998). Primer lenfoid bir organ olan bursa Fabricii kanatlılarda B-lenfositlerin yapımından sorumludur. 12.haftadan itibaren epitelde ve foliküllerin medullalarında kistlerin ortaya çıkmasıyla involüsyon olayları başlar. İnterfoliküler bağ dokusunun arttığı ve lenfoid doku yapısının ortadan kalkmasıyla sonuçlanan bu olayların hemen hemen 18.haftada tamamlandığı bildirilmektedir (Kocaöz ve ark 1997b).

### **2.3.2. Bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimi**

Bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimi üzerinde yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Hassa 1955, Shiojiri ve Takahashi 1991, Kocaöz ve ark 1997a). Bu çalışma sonuçları, organın asıl kese ve boyun kısmının epitelinin son bağırsak endoderminden, lenfoid hücrelerin ise intraembriyonik mezenkimden köken aldığını ortaya koymaktadır (Olah ve ark 1986, Lupetti ve ark 1990).

Kloakaya açılan son bağırsak duvarının dorsalinde meydana gelen epitel kalınlaşmasının ardından, bu hücrelerin arasında oluşan vakuollerin birleşmesi ile kuluçkanın 7. gününde tek boşluklu organ taslağı şekillenir (Hassa 1955, Kocaöz ve ark 1997a). Organa özgü plikaların şekillenmeleri kuluçkanın 11-12. gününde tamamlanır (Hassa 1955, Olah ve ark 1986, Kocaöz ve ark 1997a). Lenf foliküllerinin gelişmesi ise 8. günden itibaren, başlangıçta organ mezenkimindeki damarların lümeninde ve epitele uzak bölgelerde gözlenen iri-bazofilik hücrelerin, 10. günden itibaren epitelin bazalinde, belirli bölgelerde toplanmaları ile başlar (Shiojiri ve Takahashi 1991, Kocaöz ve ark 1997a, Dönmez ve Çelik 1998). Bu dönemi takiben söz konusu iri-bazofilik hücrelerin etkisiyle epitelde lümeneye doğru çıkıntı oluşturan epitel tomurcukları şekillenir (Michael ve Ratcliffe 1985, Kocaöz ve ark 1997a). Onüçüncü günden itibaren, epitel tomurcuklarının merkezlerindeki bazofilik hücre topluluğunun, yanlardan ve alt yüzden endodermal kökenli

epitel hücrelerinin devamı olan subnodüler epitel hücreleri tarafından çepeçevre çevrelendikleri, 14. günde bazofilik hücrelerin tipik lenfosit morfolojisini kazandıkları ve 15. günde ise tomurcukların organın lenf foliküllerinin medullalarına özgü yapıyı kazandıkları bildirilmektedir (Kocaöz ve ark 1997a). Subnodüler epitel katmanı, 17. günde kortiko-medullar sınır hücrelerini oluşturmakta ve bunun dış yüzünde toplanan lenfositler ise lenf folikülünün korteksini meydana getirmektedir (Kocaöz ve ark 1997a, Dönmez ve Çelik 1998).

## **2.4. Dalağın Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi**

### **2.4.1. Dalağın histolojik yapısı**

Dalak hem memeli ve hem de kanatlı hayvan türlerinde erişkin hayvanlarda, vücudun en büyük lenfoid organıdır. Sekonder (perifer) bir lenfoid organ olan dalak, sadece kanı süzerek; gerek yabancı organizmaların ve gerekse de yaşlanmış eritrositlerin dolaşımdan uzaklaştırılmasını sağlar (Kelly 1984).

Organın kapsülü ve bundan çıkan bağ dokusu trabeküllerinin oluşturduğu sistem stromayı oluşturur. Kapsül ve trabeküllerde bol miktarda düz kas telleri gözlenir. Organın paranzimi ise, bağ dokudan oluşan trabeküller arasında yer alan, beyaz ve kırmızı pulpadan oluşmuştur. Beyaz pulpa, arteria sentralis etrafında toplanmış lenfoid doku ile beyaz pulpada seyreden damarlar etrafındaki lenfatik kordonlardan oluşurken; kırmızı pulpa bol miktarda kan hücresi içeren venöz sinuslar ve kırmızı pulpa alanlarından oluşmaktadır (Kelly 1984).

Pulpanın çatısını retikulum hücreleri ile retikulum hücrelerinin oluşturduğu ağ şekillendirir. Retikulum hücre ve iplikleri arterlerin etrafında ve lenf foliküllerinin çevresinde hem daha fazla sayıda ve hem de birbirleri ile daha sıkı bir ilişki içindedirler (Kelly 1984).

Dalakta her tip kan hücresine rastlanırsa da doğal olarak en bol bulunan hücreler lenfositlerdir. Diğer sekonder lenfoid organlarda olduğu gibi dalakta da T- ve B-lenfosit bölgeleri ayırılmaz. T-lenfositler arteria sentralis etrafında yerleşim gösterirler ki bu bölge periarteriyoler lenfoid kılıf (periarterioler lymphoid sheat, PALS) olarak bilinir. B-lenfositler ise lenf foliküllerinin germinal merkezi içinde yer alırlar (Kelly 1984). Bununla



birlikte T-lenfosit alt tiplerinin yerleşimleri de yaşla birlikte farklılıklar gösterir. Tavuklarda yapılan bir çalışmada (Khan ve ark 1998) kuluçkayı takip eden ilk 5 hafta içerisinde CD4 (+) hücrelerin hem PALS'ta ve hem de venöz sinuslarda yoğunlaştığı halde, CD8 (+) hücrelerin ilk 5 haftada sadece venöz sinuslarda buldukları, bunu takip eden dönemlerde ve özellikle de 9-15. haftalar arasında PALS'a infiltre oldukları ortaya çıkarılmıştır.

#### **2.4.2. Dalağın embriyonal gelişimi**

Embriyonal dönemde dorsal mezogastriyumdan köken alan dalak taslağının üzerindeki sölom epitelinden, dalağın peritoneal örtüsü şekillenir (Maskar 1976, Kelly 1984, Latshaw 1987). Bölge mezenkiminden retikulum hücreleri gelişirken, kan yoluyla merkezi lenfoid organlardan gelen T ve B lenfositleri taslağın gözeneklerine yerleşir. Arteria sentralis etrafında toplanan bu hücrelerden lenf folikülleri (dalak cisimcikleri, Malphigi cisimcikleri) oluşur (Maskar 1976, Kelly 1984).

Fötal dönemde, bir yandan göçle gelen lenfositler dalağa yerleşirken, diğer yandan köken hücrelerden monositler, granülositer lökositler, eritrositler ve megakaryositlerin yapımı gerçekleşir. Eritrosit ve granülositer lökositlerin yapımı doğumdan ve kuluçkadan çıkıştan sonra sona ererken; megakaryositlerden trombositlerin yapımı erişkin dönemde yalnızca rat ve kedilerde söz konusudur. Lenfosit ve monosit yapımı hayat boyunca sürer. Beyaz pulpayı oluşturan lenf foliküllerinin germinal merkezleri (GC) ise, canlı antijenle karşılaştıktan sonra şekillenir (Kelly 1984).

#### **2.5. Asit Fosfataz**

Asit fosfataz (ACP-az), miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulçukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir (Catowsky 1981). Özellikle makrofajlar çok güçlü ACP-az aktivitesi gösterirler (Li ve ark 1972).

Goldberg ve Barka (1962), insan perifer kan frotilerinde, en güçlü ACP-az aktivitesine monosit ve eozinofillerde rastlamışlar; bazofillerin ise negatif reaksiyon verdiklerini tespit etmişlerdir.

Bir başka çalışmada (Kaplow ve Burstone 1964) ise insan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitivitesi gösterdikleri, monositlerin ise soluk ve sitoplazmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan diffüz pozitive gösterdikleri belirlenmiştir.

Yang ve ark (1982)'nin neoplastik ve non-neoplastik insan lenf yumrularında yapmış oldukları bir çalışmada, ACP-az için biri hem lenf yumrusu ve hem de kan frotilerindeki T-lenfositlerinde gözlenen globuler pozitive ile, sadece lenf yumrularındaki T-lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitive tiplerini gözlemişlerdir.

Kobay, fare ve ratların timositlerinde, bir ya da iri birkaç granül halinde veya sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüller tarzındaki ACP-az pozitivitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise diffüz non-granüler pozitive gözlenmektedir (Tamaoki ve Esner 1969, Seymour ve ark 1978).

Basso ve ark (1980) insanlarda timositlerde erken fetal dönemde kazanılan ACP-az pozitivitesinin doğumdan sonra da perifer kan T-lenfositlerinde de güçlü bir şekilde gözlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte tavuklarda, T-lenfositlerin ACP-az pozitivite konusundaki farklı görüşler vardır. Glick (1988) ile Moriya ve Ichikawa (1989), bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin korteks ve medullaları ile timus'un hem korteks ve hem de medullasında ACP-az içeren lenfositlerin bulunduğunu; bu nedenle de söz konusu enzimin tavuk T-lenfositlerine özgü olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu enzim pozitivitesinin, kanatlı lenfoid dokularının gelişimlerinin incelenmesinde önemli bir kriter olabileceğini de ileri sürmektedirler (Glick 1988, Moriya ve Ichikawa 1989). Bazı araştırmacılar (Graczyk 1984, Graczyk 1987, Slowik ve ark 1990) ise neo-natal dönemde bursektomize ettikleri civcivlerin kan dokuları ile dalaklarındaki foliküllerin GC'lerinde ACP-az pozitif lenfosit oranlarında önemli düşüşler meydana geldiğini bildirmektedirler.

## **2.6. Beta Glukuronidaz**

Asit hidrolazlar grubundan bir enzim olan (Pangalis ve ark 1978, Catowsky 1981) beta glukuronidaz (BG-az), T-lenfositlerde, B-lenfositlerden daha yüksek oranda bulunmaktadır (Pangalis ve ark 1978, Seymour ve ark 1978, Machin ve ark 1980). Lizozomal bir enzim olduğuna inanılmakla birlikte (Lorbacher ve ark 1967, Li ve ark

1972, Pangalis ve ark 1977), yapılan elektron mikroskopik çalışmalar enzimatik pozivitivenin sitoplazmadaki dağılımı ile lizozomlar arasında farklar olduğunu ortaya koymakta ve bu durum da, her lizozomun BG-az içermeyebileceğini akla getirmektedir (Lorbacher ve ark 1967).

BG-az aktivitesi, lenfoid dokulardaki T-lenfosit bölgelerindeki lenfositlerden başka makrofajlar (Lorbacher ve ark 1967, Ramos ve ark 1992), retikulum hücreleri (Ramos ve ark 1992) ve trombositlerde de (Lorbacher ve ark 1967) bulunur. Perifer kan frotilerinde ise T-lenfositleri yanında eozinofil ve nötrofil granüositler ile monositlerde de BG-az aktivitesi tespit edilmiştir (Lorbacher ve ark 1967, Machin ve ark 1980). Lenfositlerdeki pozivitite sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış olan bir ya da birkaç granüller tarzında gözlenirken (Lorbacher ve ark 1967, Yam ve Mitus 1968, Machin ve ark 1980, Ramos ve ark 1992), monosit ve makrofajların poziviteleri ise sitoplazma içinde homojen dağılmış, diffüz non-granüler tarzdadır (Lorbacher ve ark 1967, Machin ve ark 1980, Ramos ve ark 1992). İnsanlarda ise, fetal dönemden itibaren T-lenfosit olgunlaşmasının ilerlemesi ile birlikte BG-az pozivititesi oranının da arttığı bildirilmektedir (Basso ve ark 1980).

## 2.7. Alfa Naftil Asetat Esteraz

Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) lizozomal bir enzimdir (Knowles ve ark 1978, Zicca ve ark 1981). Pratikte, gerek doku ve gerekse de perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırdedilmelerinde yararlanılan bu enzimin (Mueller ve ark 1975, Higgy ve ark 1977, Knowles ve Holck 1978, Pangalis ve ark 1978, Ranki 1978, Knowles ve Halper 1980, Pruthi ve ark 1987, Ramos ve ark 1992), T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanıldığı bildirilmiştir (Basso ve ark 1980). ANAE, T-lenfosit olgunlaşması sırasında son dönemde kazanılan bir enzimdir. Nitekim Çelik ve ark (1992)'nin sığır fütüslerinde yapmış oldukları bir çalışmada, fütüslerin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlanılmış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte pozitif lenfosit oranlarının da arttığı tespit edilmiştir. Öteki esteraz grubu enzimler gibi aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır (Mueller ve ark 1975). Başta insan olmak üzere (Li ve ark 1972, Çelik ve ark 1991), sığırlar (Yang ve ark 1979, Kajikawa ve ark 1983), tavuklar (Maiti ve ark 1990), köpekler

(Wulff ve ark 1981) ve farelerde (Mueller ve ark 1975) T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir.

Timus dokusunda yapılan çalışmalarda, timusun kortiko-medullar sınıra yakın bölgelerindeki medullar timositlerin pozitif reaksiyon verdikleri halde, kortekste lokalize olan timositlerin negatif reaksiyon verdikleri bildirilmektedir (Mueller ve ark 1975, Ranki 1978).

ANAE pozitifitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipi tespit edilmiştir (Higgy ve ark 1977, Zicca ve ark 1981, Çelik ve ark 1991). Bunlardan ilki, bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tarzındaki pozitivite (Dot Like Positivity Pattern), T-lenfositlere özgü olan pozitivitedir (Higgy ve ark 1977, Knowles ve Holck 1978, Knowles ve ark 1978, Wulff ve ark 1981, Zicca ve ark 1981, Kajikawa ve ark 1983, Pruthi ve ark 1987, Çelik ve ark 1991). İkinci pozitivite tipi ise ince-granüler boyanmadır (Fine Granuler Positivity Pattern). Bu tarz boyanmanın "Null Cells" olarak da adlandırılan hücrelere özgü olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Higgy ve ark 1977). B-lenfositlerinin ise ANAE negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir (Mueller ve ark 1975, Higgy ve ark 1977, Pangalis ve ark 1978, Ranki 1978, Pinkus ve ark 1979, Çelik ve ark 1991). Monosit ve makrofajlarda ise sitoplazmada diffüz ve güçlü bir pozitivite gözlenmektedir (Higgy ve ark 1977, Pinkus ve ark 1979, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991).

Lenfositlerde tespit edilen pozitivite tipleri göz önüne alınarak, lenfoid dokularda yapılan çalışmalarda; ANAE pozitif hücrelerin, lenf yumrularında parakortikal (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981) ve interfoliküler bölgelerde, tonsillalarda interfolliküler bölgelerde (Knowles ve Holck 1978), dalakta arteriya sentralis'i saran periarteriyoler lenfoid kılıfta (Mueller ve ark 1975, Knowles ve Holck 1978) ve timusta medulla bölgesinde lokalize oldukları tespit edilmiştir. Lenf yumruları ile dalak ve tonsillaların lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki lenfositler ile kortikal timositler ANAE negatif reaksiyon vermekteler (Mueller ve ark 1975, Knowles ve Holck 1978, Wulff ve ark 1981).

Farklı türlerin perifer kanlarındaki ANAE pozitif lenfosit oranları ise oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-%75 (Ranki 1978, Çelik ve ark 1991), köpeklerde %56-%78 (Wulff ve ark 1981), tavuklarda %35 (Pruthi ve ark 1987) ve sığırlarda ise %47,7 (Kajikawa ve ark 1983) oranında ANAE pozitif lenfosit bulunmaktadır.

Bu çalışmada dömlü tavuk yumurtasına farklı dozlarda verilen AFB<sub>1</sub>'in, kanatlı timusu, bursa Fabricii'si ve dalağının embriyonal dönemdeki gelişmeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada AFB<sub>1</sub>'in etkilerinin kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde de belirlenmesi amacıyla kuluçkadan çıkışın birinci günü ve 4.haftasında kan ve lenfoid doku örnekleri alınarak söz konusu organlar üzerinde histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle incelemeler gerçekleştirildi.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.2. Yumurta materyali:

Bu amaçla, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolleri yapılan ve ölçülebilir düzeyde aflatoksin içermeyen yemle beslenen Babcock B-380 ırkı kahverengi yumurtacı damızlıklara ait toplam 651 adet yumurta kullanıldı.

##### 3.1.2. Aflatoksin B<sub>1</sub>:

Çalışmada, kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> standardı (Makor Chemical Co., Jerussalem, Israel) kullanıldı.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Aflatoksin B<sub>1</sub> solüsyonlarının hazırlanması

Kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) standardı, benzen içinde çözdürülmek suretiyle 20 µg/ml konsantrasyonunda AFB<sub>1</sub> içeren stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon, çalışmada kullanılacak olan her bir konsantrasyon grubu için gerekli olan AFB<sub>1</sub>'i içerecek hacimlerde steril haldeki farklı tüplere (viallere) aktarılarak; karanlıkta bekletildi ve benzenin tamamen uçması sağlandı. AFB<sub>1</sub> içeren tüplere önceden belirlenen miktarlarda %99,9'luk etil alkol (ETOH) ilave edilerek AFB<sub>1</sub> tamamen eritildi. Takiben etil alkol konsantrasyonunu %30'a düşürmek amacıyla, solüsyonlara steril bidistile su ilavesi yapılarak istenilen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içeren çalışma solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların istenilen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içerip içermedikleri, standart plakalar (Merck) kullanılarak ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) ve Floresans Spektrofotometre (Perkin Elmer MPF 43-A; emisyon 425nm, eksitasyon 365nm dalga boyunda) yöntemleriyle kontrol edildi ve çalışma solüsyonunun istenen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içermeleri sağlandı. Tüpler alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.2. Deney gruplarının oluşturulması ve AFB<sub>1</sub> solüsyonlarının yumurtalara verilmesi

Bu amaçla yumurtalar, enjekte edilen AFB<sub>1</sub> miktarları ve içerdikleri yumurta adetleri aşağıda verilmiş olan 7 gruba ayrıldı.

**1.Grup (Kontrol-1):** Hiçbir işlem uygulanmayan grup. Bu gruptaki toplam 86 adet yumurtaya hiçbir işlem uygulanmadı.

**2.Grup (Kontrol-2):** Seksen adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalar küt uçlarından delindiler ve derhal sıvı parafinle kapatıldıktan sonra kuluçka makinasına yerleştirildiler.

**3.Grup (%30 ETOH-grubu):** Seksenüç adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalara küt uçlarından açılan delikten, hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk ETOH enjekte edildi.

**4.Grup (5 ng AFB<sub>1</sub> grubu):** Seksenadiz adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalara, küt uçlarından açılan delikten, hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülmüş 5 ng AFB<sub>1</sub> enjekte edildi.

**5.Grup (10 ng AFB<sub>1</sub> grubu):** Doksanyedi adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalara, küt uçlarından açılan delikten, hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülmüş 10 ng AFB<sub>1</sub> enjekte edildi.

**6.Grup (20 ng AFB<sub>1</sub> grubu):** Doksanyedi adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalara, küt uçlarından açılan delikten, hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülmüş 20 ng AFB<sub>1</sub> enjekte edildi.

**7.Grup (40 ng AFB<sub>1</sub> grubu):** Yüzyirmi adet yumurtanın bulunduğu bu gruptaki yumurtalara, küt uçlarından açılan delikten, hava kamarası yoluyla 20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülmüş 40 ng AFB<sub>1</sub> enjekte edildi.

Bu işlemlerden önce tüm yumurtalar tartıldı ve küt uçları %96'lık etil alkol ile dezenfekte edildi. AFB<sub>1</sub>'in enjeksiyonu için hava kamarası tercih edildi. Tüm enjeksiyonlar kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Deliklerin açılmasında özel yumurta delicisi kullanıldı. Deliklerin kapatılmasında ise sıvı parafinden yararlanıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikropipet (Sealpette, Jencons, Finland) kullanılarak yapıldı. Kuluçka işlemleri S.Ü.Veteriner Fakültesi'nin Deneme Ünitesi'ndeki 16.000 yumurta kapasiteli kuluçka makinasında (Söktav) optimal koşullarda (37,8 °C sıcaklık ve %65 nisbi nem) gerçekleştirildi.

### 3.2.3. Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması

Timus ve bursa Fabricii'nin embriyonal dönemdeki gelişim aşamalarını incelemek amacıyla kuluçkanın 7, 10, 12, 13, 15 ve 18. günlerinde ve dalağın embriyonal gelişim aşamalarını incelemek amacıyla ise kuluçkanın 12, 13, 15 ve 18. günlerinde, her gruptan 6'şar adet yumurta açıldı. Hamburger-Hamilton (1951) skalası esas alınarak embriyoların gelişme evreleri belirlendi. Embriyonal dönemin 7 ve 10. günlerinde alınan doku örneklerinin tamamı %10'luk tamponlu formol sıvısında tespit edilirken; embriyonal dönemin 12. gününden itibaren alınan doku örneklerinin yarısı %10'luk tamponlu formol sıvısına diğer yarısı da enzim histokimyasal çalışmaların gerçekleştirilebilmesi amacıyla her enzim için özel olarak hazırlanan tespit sıvılarına alındılar. Bu amaçla alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) için +4 °C'de tamponlu formol-sükroz solüsyonu (Knowles ve Holck 1978), asit fosfataz (ACP-az) (Barka ve Anderson 1962) ve beta-glukuronidaz (BG-az) (Lorbacher ve ark 1967) için ise formol-kalsiyum solüsyonu hazırlandı.

Kuluçkadan çıkışın ilk günü ve kuluçkadan çıkışı takip eden 4.hafta sonunda her gruptan 6'şar hayvandan kan ve doku örnekleri alındı. Bu doku örnekleri de iki parçaya ayrılarak; bir yarısı %10'luk tamponlu formol solüsyonunda tespit edilirken, diğer yarısı da yukarıda belirtilen ve her enzim için ayrı olarak hazırlanan tespit sıvılarında 24 saat süreyle tespit edildiler. Tespiti takiben +4 °C'deki Holt solüsyonuna aktarılan doku örnekleri bu solüsyonda 22 saat bekletildi. Bu doku örneklerinden kriyostatta (Slee London) alınan 12 µm kalınlığındaki kesitler, önceden formol-jelatin ile muamele edilmiş olan lamlara çekilerek oda sıcaklığında (20 °C'de) 30 dakika süreyle kurutuldu.

Alınan kan örneklerinden her enzim tipinin perifer kandaki lökositlerin pozitifite oranlarının belirlenmesi amacıyla 2'şer adet, lökosit formüllerinin belirlenmesi amacıyla da 2'şer adet frotiler hazırlandı. Havada kurutulan frotilerden ANAE demonstrasyonu yapılacak olanlar -10 °C'deki glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH=4,8) 3 dakika (Maiti ve ark 1990), ACP-az demonstrasyonu yapılacak olan frotiler + 4 °C'de formol-kalsiyum (pH=7) tespit solüsyonunda 10 dakika (Goldberg ve Barka 1962) ve BG-az demonstrasyonu yapılacak olan frotiler ise formol-metanol (7v:3v) tespit solüsyonunda + 4 °C'de 1 dakika (Lorbacher ve ark 1967) süreyle tespit edildiler. Bu sürelerin sonunda distile su ile 3 kez yıkanan frotiler oda sıcaklığında kurutuldular.



Kurumayı takiben kesitler ve frotiler aşağıda ayrıntıları verilen ve her enzim için ayrı ayrı hazırlanan inkübasyon solüsyonlarında gerekli sürelerde inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda 3'er defa distile suyla yıkanan preparatlara, asetat tamponunda (pH=4,8) hazırlanmış olan %1'lik methyl-green (Merck) ile çekirdek boyası uygulandı.

#### **3.2.4. Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) demonstrasyonu**

##### **İnkübasyon işlemi**

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0,8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, N-8505-Sigma) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2,4 ml %4'lük sodyum nitrit (S-3421, Merck) solüsyonu ile 2,4 ml pararozanilin (P-3750, Merck) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesi sonucunda elde edilen 4,8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,8'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri 37 °C'de 2 saat, doku kesitleri ise oda sıcaklığında 10 dakika süreyle kontrollü bir şekilde bekletildiler. Kırmızı-kahverengi granüllerin ortaya çıkmasının ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı.

#### **3.2.5. Asit fosfataz (ACP-az) demonstrasyonu**

##### **İnkübasyon işlemi**

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan tamponlu Michael'in Veronal-asetat solüsyonu ile, substrat olarak 1 ml N,N-dimetilformamide içerisinde çözdürülmüş 10 mg Naphthol AS-BI phosphate (N-2125, Sigma) kullanıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 1,6 ml hekzazotize edilmiş (0,8 ml pararozanilin, 0,8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklendi. Karışımın son pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,0'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri oda sıcaklığında 1 saat, doku kesitleri ise 15 dakika kontrollü bir şekilde bekletildiler. Hücre sitoplazmalarında spesifik kırmızı granüllerin oluşumunun ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi. Üç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı.

### 3.2.6. Beta-glukuronidaz (BG-az) demonstrasyonu

#### İnkübasyon işlemi

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan 0,1 M asetat tamponunun 50 ml'sine içerisinde 14 mg substrat (Naphthol AS-BI glucuronic acid, N-1875, Sigma) ve 0,6 ml sodyum bikarbonat solüsyonu (210 mg sodyumbikarbonat, 50 ml distile su) ilave edildi. Kromojen madde olarakta 0,6 ml heksazotize edilmiş pararozanilin (0,3 ml pararozanilin, 0,3 ml %4'lük sodyum nitrit solüsyonu) kullanıldı. 5 ml substrat solüsyonu üzerine önce 0,6 ml kromojen solüsyonu, ardından da 5 ml distile su ilavesi ile elde edilen karışımın son pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,2'ye ayarlanarak süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonunda kan frotileri 37 °C'de 3 saat, doku kesitleri ise 30 dakika süreyle kontrollü şekilde bekletildiler. Spesifik kırmızı granüllerin oluşumunun ardından inkübasyon sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı.

Yüzde onluk tamponlu formol sıvısında tespit edilen dokular rutin histolojik metotlarla takipleri yapılarak parafinde bloklandılar. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Crossman'ın üçlü boyaması (Culling ve ark 1985), methyl-green pyronin (Stewens ve Bancroft 1990), Gordon ve Sweets'in retiküler iplik boyaması (Bradbury ve Gordon 1990) ile Pappenheim'in Panoptik boyama (Konuk 1981) yöntemleriyle boyandılar. Her gruptan alınan bir kesite ise periodic-acid schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı (Cook 1990).

Yapılan mikroskopik incelemelerde, ANAE demonstrasyonu yapılan frotilerdeki lenfositlerden 1-5 arasında değişen sayılarda kiremit kırmızısı-kahverengi granüle sahip olan lenfositler ANAE pozitif olarak kabul edilirlerken; reaksiyon göstermeyenler ANAE negatif olarak değerlendirildiler. Doku kesitlerinde ise bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi granüle sahip olan lenfositler ANAE pozitif olarak kabul edilirken; reaksiyon göstermeyenler ANAE negatif olarak değerlendirildiler.

ACP-az demonstrasyonu yapılan frotilerdeki lenfositlerden 1-3 arasındaki sayıda kırmızı granüle sahip olan lenfositler ACP-az pozitif olarak kabul edilirken; reaksiyon göstermeyenler ACP-az negatif olarak değerlendirildiler. Doku kesitlerindeki lenfositler de benzer şekilde değerlendirildiler.

BG-az demonstrasyonu yapılan kan frotileri ve doku kesitlerindeki lenfositlerden de 1-3 arasında kırmızı granüle sahip olan lenfositler BG-az pozitif olarak kabul edilirken;

reaksiyon göstermeyenler BG-az negatif olarak değerlendirildiler. Doku kesitlerindeki lenfositler de benzer şekilde değerlendirildiler.

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları belirlenirken, May-Grünwald-Giemsa (Konuk 1981) yöntemi ile boyanan diğer kan preparatlarında farklı lökosit tiplerinin oranları (%) tespit edildi.

Hazırlanan preparatlar Leitz Laborlux-12 model araştırma mikroskobunda incelenerek; gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları Leitz Ortholux-II model araştırma mikroskobuyla çekildi.

### **3.2.7. İstatistiki analizler**

Embriyonik ölüm oranlarının belirlenmesinde khi-kare testi uygulanırken, kan sayımı sonuçları Açı (Arc Sinus) transformasyon metodu kullanılarak analiz edildiler (Yıldız ve Bircan 1991). Bu metoda göre, transforme edilen verilere tek yönlü varyans analizi yapıldı. Grupların parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırmalarında Tukey testinden yararlanılırken, verilerin tablolaştırılmasında transformasyon öncesi gerçek değerler kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular

Çalışmada kullanılan 651 adet yumurtanın toplam 620 adedi fertil olup, ortalama infertilite oranı % 4,76 olarak tespit edildi. Embriyonik ölüm oranlarının belirlenmesinde yalnızca embriyo içeren yumurta sayıları esas alındı. Kontrol-1 grubunda mortalite %1,204 iken, yalnızca delip-kapatılan yumurtalardan oluşan kontrol-2 grubunda ise bu değer %7,89 idi (Grafik 4.1). Solvent olarak kullanılan %30'luk etanol (%30 ETOH) solüsyonunun verilmiş olduğu yumurtalardaki mortalite ise % 20,25 olarak tespit edildi. Tablo 4.1'de de görüldüğü gibi AFB<sub>1</sub> verilen gruplardaki mortaliteler oldukça yüksekti. Bu değer, 5 ng AFB<sub>1</sub> grubunda % 41,66 iken, 10 ng AFB<sub>1</sub> grubunda % 43,47 olarak tespit edildi. Bu iki grubun mortalite değerleri arasındaki fark önemsiz ( $p>0,05$ ) iken, diğer grupların mortalite değerleri arasındaki farklar önemliydi ( $p<0,05$ ). Özellikle 20 ng ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının mortalitelerinin oldukça yüksek olduğu (sırasıyla % 80,43 ve % 91,22) dikkati çekti.

Kontrol-1, kontrol-2 ve % 30 ETOH gruplarındaki embriyoların Hamburger-Hamilton (1951) skalasına (H-H) uygun gelişme evreleri gösterdikleri halde, AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalardan elde edilen embriyolarda doza bağlı olarak artan oranlarda gelişme gerilikleri ve anomaliler gözlemlendi (Şekil 1 ve 2). Genel gelişme geriliği yanında karın duvarının kapanmaması sonucu karın organlarının dışarıda olması (Schistosoma reflexum) (Şekil 3), makas gaga (Şekil 4) ve unilateral mikroftalmi en sık rastlanan anomali tipleri idi (Şekil 5).

AFB<sub>1</sub> verilen gruplardan, 5 ng AFB<sub>1</sub> grubundaki embriyonik ölümlerin çoğunlukla kuluçkanın ilk 7 gününde (HH-31) gerçekleştiği halde, 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki embriyonik ölümler daha çok kuluçkanın ilk 4,5 gününde (HH-25) gerçekleşti. Verilen AFB<sub>1</sub> dozunun artmasıyla birlikte, özellikle 40 ng AFB<sub>1</sub> grubunda oluşan embriyonik ölümlerin, kuluçkanın daha erken evrelerinde ve özellikle de ilk 70-72. saatlerinde (HH-20) gerçekleştiği dikkati çekti (Grafik 4.2). Bu grupta embriyoların tamamının öldüğü ve en ileri aşamadaki embriyonun 15.güne ait olduğu (HH-41-42) tespit edildi.

Deney gruplarından, 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında düşük oranlarda (sırasıyla %8,5 ve %12,5); ancak 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplardaki yumurtalarda daha yüksek oranda (sırasıyla %17,5 ve %27,8) olmak üzere, embriyonal disk sahasının (diskoblastula) area opaca'sını oluşturan hücrelerin aşırı çoğalarak disk sahasının periferine yayıldıkları ve area pellucida'yı saran kalın bir hücresel yüzük oluşturdıkları gözlemlendi (Şekil 6). Böyle yumurtaların önemli bir oranında area pellucida dışı doğru fitiklaşmış haldeydi (5, 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında sırasıyla %2,8, %5, %10,8 ve %14,4). Area opaca'yı oluşturan ve kalınlaşmış hücresel katmandan alınan kesitlerdeki area opaca hücreleri epiteloid karakterdeki hücreler halinde gözlemlendiler (Şekil 7 ve 8).

## **4.2.Kontrol ve Deney Gruplarında Timusun Embriyonal Gelişimi**

### **4.2.1.Kuluçkanın yedinci günü**

Her iki kontrol grubunda da kuluçkanın yedinci gününde sulcus jugularis boyunca vena jugularis'e paralel olarak yerleşmiş olan taslak halindeki timus loplarda, taslak içerisine infiltre olmuş haldeki iri-bazofilik hücreler gözlemlendi (Şekil 9). Bu dönemde iri bazofilik hücrelere, perifer kan preparatlarında da rastlandı (Şekil 10). Aynı dönemde deney ve kontrol gruplarının timus taslakları arasında belirgin histolojik farklar gözlemlenmedi.

### **4.2.2.Kuluçkanın onuncu günü**

Onuncu günde kontrol grubundaki hayvanların timus taslağı sulcus jugulariste aralıklarla yerleşmiş ve geniş mezenkimal alanlarla birbirlerinden ayrılmış olan küçük loplardan oluşmaktaydı. Bu loplarda merkezi bölgelerinde vaskülarizasyonun artmış olduğu dikkati çekti (Şekil 11). Bu dönemde, deney gruplarından 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki embriyolarda timusun gelişiminin belirgin bir şekilde baskılanmış olduğu ve taslak halindeki loplarda daha küçük olduğu tespit edildi (Şekil 12).

### **4.2.3.Kuluçkanın onikinci günü**

Kuluçkanın onikinci gününde, kontrol grubu hayvanlarda loplara saran kapsülü oluşturacak olan mezenkimal dokunun biraz daha gelişmiş olduğu ve loplara tam olmayan lopçuklara ayırdığı gözlemlendi. Bu dönemde loplarda merkezi bölgelerindeki kan damarlarındaki artış dikkati çekerken, korteks-medulla ayırımı tam olarak yapılamamaktaydı (Şekil 13). Ancak, PAS pozitif reaksiyon veren dejenere retikulum hücrelerine ilk kez bu dönemde loplarda orta bölgelerinde rastlandı (Şekil 15). Loplarda

saran mezenkimal doku ile bunun loplara içine giren dallarında retiküler ipliklere de ilk kez bu dönemde rastlandı.

Deney gruplarında ise loplardaki gelişimin, kontrol gruplarındakinden oldukça geride ve gelişme geriliğinin, özellikle 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundaki embriyoların timuslarında daha belirgin olduğu, aynı zamanda loplara merkezi bölgelerindeki vaskülarizasyonun da dikkati çekecek biçimde daha zayıf olduğu göze çarpmaktaydı (Şekil 14). Kontrol-1 grubunda, alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pozitifitesi gösteren ve lenfosit morfolojisine sahip olan hücrelere ilk kez bu döneme ait timus dokusu örneklerinde rastlandığı halde (Şekil 16), aynı dönemden alınan kan örneklerinde ANAE pozitif lenfosit gözlenmedi. Bu dönemde timus kesitlerindeki lenfosit morfolojisine sahip olan az sayıdaki hücrede asit fosfataz (ACP-az) pozitifitesi tespit edildi (Şekil 17). Perifer kanda ise ACP-az pozitif lenfosit nadiren rastlandı (Şekil 18). Timus dokusundaki lenfositlerde gözlenen pozitifite tipi çoğunlukla hücrenin bir kutbunda yerleşmiş olan tek bir kırmızı granül tarzındayken (Şekil 19), perifer kanda bir ya da birkaç adet kırmızı granül tarzındaydı (Şekil 20, oklar). Ayrıca yine bu döneme ait perifer kan örneklerindeki trombositlerde de ACP-az pozitifitesi tespit edildi (Şekil 20, çift oklar). Deney gruplarından elde edilen ACP-az pozitifitesi oranları, kontrol gruplarındakinden belirgin biçimde daha düşüktü. Nitekim istatistiksel analiz sonuçları gruplar arasındaki farkların önemli olduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ , Tablo 4.2, Grafik 4.3).

Kuluçkanın onikinci gününde perifer kanda beta glukuronidaz (BG-az) pozitifitesi gösteren lenfositlere rastlanmadı. Bu dönemde timus dokusundaki az sayıdaki lenfositte zayıf BG-az aktivitesi tespit edildi. BG-az pozitifitesi ACP-az pozitifitesi ile büyük benzerlik göstermekteydi (Şekil 21).

#### **4.2.4.Kuluçkanın onüçüncü günü**

Kuluçkanın onüçüncü gününde, timus loplara, hücreden nispeten fakir olan ve soluk boyanan medulla ile hücreden zengin ve koyu boyanan korteks, birbirlerinden az da olsa ayrılabilmekteydi (Şekil 22). Özellikle lopçukların korteks bölgelerinde, sitoplazmalarında boya alan granüllere sahip makrofajlar (Tingible Body Macrophage, TBM) sıklıkla gözlemlendi (Şekil 23). Bu dönemde, deney gruplarından alınan timus loplara kesitlerinde yapılan incelemelerde, özellikle 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında belirgin bir gelişme geriliği dikkati çekti. Bu gruplarda korteks-medulla ayırımı belirgin değildi (Şekil

24). Bu dönemde de hem kontrol ve hem de deney gruplarının perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositte rastlanmadı. Ancak ACP-az pozitivitesi gösteren lenfosit oranlarında belirgin artışlar gözlemlendi. En yüksek orana kontrol-1 grubu sahip iken bunu sırasıyla kontrol-2, %30 ETOH, 5 ng AFB<sub>1</sub>, 10 ng AFB<sub>1</sub>, 20 ng AFB<sub>1</sub> ve 40 ng AFB<sub>1</sub> grupları izledi. Kontrol-1 grubunun ACP-az pozitif lenfosit oranı 10 ng, 20 ng ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarınıninkinden önemli oranda ( $p < 0,05$ ) yüksek bulundu (Tablo 4.2). Bu dönemde, bazı trombositler ile granülositlerin bazı hücrelerinde de diffüz sitoplazmik ACP-az pozitivitesi saptandı (Şekil 25). Timus dokusunun genel histolojik yapısı, onikinci gündekine büyük benzerlik göstermekle birlikte; ACP-az pozitif hücrelerde, 12.güne ait timus dokusuna nazaran belirgin bir azalma dikkati çekti.

Perifer kan lenfositlerinde BG-az pozitivitesine ilk kez bu dönemde ve oldukça düşük oranda (% 2) rastlandı. (Şekil 26). Timustaki az sayıdaki lenfositte BG-az aktivitesi gözlemlendi.

#### 4.2.5.Kuluçkanın onbeşinci günü

Kuluçkanın onbeşinci gününde, loplardaki korteks ve medulla bölgeleri 13.gündekinden daha belirgin olarak ayrılmakta ve hücreden zengin olduğu için koyu boya alan kortekste çoğunlukla küçük lenfositler bulunmaktaydı (Şekil 27). Medullada, eozinofilik granüllere sahip hücre infiltrasyonu göze çarpılmaktaydı. Bu dönemde loplara saran kapsül ve bunun lopçuklar arasında uzanan dalları içinde retikulum iplikleri artmış durumdaydı.

Deney gruplarından özellikle 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının timuslarındaki belirgin gelişme geriliğinin bir sonucu olarak loplara, kontrol grupları ile 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındakinden belirgin biçimde daha küçük oldukları ve loplarda korteks-medulla ayırımının da daha az belirgin olduğu dikkati çekti.

Timus kesitlerinde ANAE pozitif lenfositlere loplara merkezi bölgelerinde sıklıkla rastlandı. Bu dönemde de perifer kanda ANAE pozitif lenfositte rastlanmadı.

ACP-az pozitif lenfositlere bu dönemde de perifer kanda sıklıkla rastlandı (Şekil 28). Trombositler ile bazı granülositlerde de ACP-az pozitivitesi gözlemlendi. ACP-az oranının onüçüncü gündekinden biraz daha düşük olduğu tespit edildi. Perifer kandaki

ACP-az pozitif lenfositlerin 10, 20 ve 40 ng gruplarındaki oranlarının, kontrol gruplarınıninkilerden önemli ( $p<0,05$ ) oranda daha düşük oldukları tespit edildi (Tablo 4.2). Bu dönemde loplara hem korteks ve hem de medullalarında ACP-az pozitif lenfositlere rastlandı (Şekil 29). Aynı dönemde 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında timus loplardaki belirgin gelişme geriliğine bağlı olarak timus kesitlerinde ACP-az pozitif hücrelere de daha seyrek rastlandı. Perifer kan örneklerinde yapılan incelemelerde grupların hiçbirinde BG-az aktivitesine sahip lenfosit bulunmadığı ve timus dokusunda da BG-az pozitif lenfositlerin belirgin bir şekilde azalmış olduğu dikkati çekti.

#### 4.2.6.Kuluçkanın onsekizinci günü

Kuluçkanın onsekizinci gününde timusun histolojik gelişiminin hemen hemen tamamlanmış olduğu ve loplarda korteks-medulla ayrımının oldukça belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 30). Loplara interlobuler bağ dokusu bölmelerinin genişlemiş, medulla bölgelerindeki vakülarizasyonun da oldukça belirgin bir şekilde artmış olduğu ve bu bölgedeki PAS pozitif dejenere retikulum hücreleri ile kistik yapıların irileşerek belirginleştikleri dikkati çekti (Şekil 31). Ayrıca iri ve pironinofilik sitoplazmalı hücrelere de bölgede sıklıkla rastlandı (Şekil 32). Loplara saran kapsül ile bunun organ içerisine göndermiş olduğu bölmelerdeki retikulum ipliklerinin daha kalın demetler oluşturdukları tespit edildi (Şekil 33).

Perifer kanda ANAE pozitif lenfositlere ilk kez kuluçkanın onsekizinci gününde ve oldukça düşük oranda (%2) rastlandı (Şekil 34). Bu dönemden alınan timus kesitlerinde ANAE pozitif lenfositlere önceki dönemlerdekinden daha sıklıkla rastlandı. Medullada, sitoplazmalarında sodyum florid (NaF)'e duyarlı, diffüz granüler ANAE pozitifitesi gösteren retikulum hücreleri ve makrofajlar da sıklıkla gözlemlendi.

Perifer kanda ACP-az aktivitesine lenfositler, trombositler ve bazı granülositler seri hücreleri ile monositlerde de rastlandı. BG-az aktivitesine ise sadece monositlerde rastlanırken, timus kesitlerinde ise az sayıda BG-az pozitif lenfosit göze çarpmaktaydı.

Yapılan istatistiksel analiz sonuçları, sadece 20 ng AFB<sub>1</sub> grubunun diğer gruplardan önemli oranda ( $p<0,05$ ) daha düşük ACP-az pozitif lenfosit oranlarına sahip olduğunu ortaya koydu (Tablo 4.2).



#### 4.2.7.Kuluçkadan çıkışın ilk günü

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde histolojik gelişimi tamamlanmış olan civciv timusu loplarnın ve medulla bölgesinde yer alan kistik yapıların, kuluçkanın onsekizinci günündekinden biraz daha irileştikleri dikkati çekti (Şekil 35). TBM'lere bu dönemde özellikle kortekste sıklıkla rastlandı. Bu hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda apoptotik cisimciklerin fagosite edilmiş şekilleri olan cisimciklerin bulunduğu dikkati çekti (Şekil 36). Loplarnın medullalarındaki PAS pozitif Hassal cisimcikleri ile kistik yapıların biraz daha irileşmiş oldukları gözlemlendi. Loplarnın retikulum iplikleri ağının daha da geliştiği ve yaygınlaştığı dikkati çekti (Şekil 37). Kontrol grupları ile %30 ETOH, 5 ng AFB<sub>1</sub> ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının timusları arasında belirgin histolojik farklar tespit edilmedi.

Bu dönemde, grupların perifer kan lenfosit oranları ile ANAE pozitif lenfosit oranları Tablo 4.3'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi kontrol grupları ile %30 ETOH grubu arasındaki farklarla, 5 ile 10 ng AFB<sub>1</sub> grupları arasındaki farkın önemli olmadığı ( $p>0,05$ ), ancak AFB<sub>1</sub> verilen grupların önemli oranda ( $p<0,05$ ) düşük lenfosit ve ANAE pozitif lenfosit oranlarına sahip oldukları dikkati çekti (Tablo 4.3).

Bu dönemde, grupların ACP-az pozitif lenfosit oranları kuluçkanın onsekizinci günündekinden daha yüksek olmakla birlikte; gruplar arasındaki farklar önemsiz bulundu ( $p>0,05$ , Tablo 4.2). Timus kesitlerinde ise ACP-az pozitif lenfositlere hem korteks ve hem de medullada rastlandı. Her iki bölgede de diffüz pozitivite gösteren retikulum hücreleri ve makrofajlar gözlemlendi (Şekil 38). Perifer kan örneklerinde BG-az pozitif lenfositlere rastlanmazken, monositlerde diffüz pozitivite tespit edildi (Şekil 39). Timus kesitlerinde ise, korteks-medulla sınırına yakın bölgelerde lokalize olan az sayıda BG-az pozitif lenfositlere rastlandı (Şekil 40).

#### 4.2.8.Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta

Kuluçka sonrası dönemin dördüncü haftasında timus loplarnın medullalarındaki kistik yapılar ile Hassal cisimciklerinin irileştikleri ve sayılarının artmış olduğu (Şekil 41), bu yapıların merkezi bölgelerinde dejenere lenfositlerle granülositlerin bulunduğu gözlemlendi. Medulla bölgesinde ikişer-üçerli gruplar halinde plazma hücrelerine de rastlandı. Loplarnı saran kapsülden çıkan retikulum iplikleri, interlobuler intersitisyumda devam ederek bölgedeki damarların tunika adventisyalarna karışmaktaydı. Loplarnın histolojik yapılarında gruplar arasında belirgin farklar gözlemlenmedi.

Bu dönemde grupların perifer kan lenfosit oranları ile ANAE pozitif lenfosit oranları arasındaki farkların önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu tespit edildi (Tablo 4.3). ANAE pozitif lenfositlere timus dokusunda çoğunlukla medullada rastlanırken, gerek medullada ve gerekse de kortekste NaF'a duyarlı, diffüz ANAE pozitivitesi gösteren retikulum hücreleri ve makrofajlar gözlemlendi (Şekil 42).

Aynı dönemde, perifer kan lenfositlerinde, heterofillerde, eozinofillerde ve bazı trombositler ile monositlerde ACP-az pozitivitesi gözlemlendi (Şekil 43). Tablo 4.2'de de görüldüğü gibi grupların ortalama ACP-az pozitif lenfosit oranları arasındaki farkın önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu tespit edildi. Timusun hem korteks ve hem de medullasında ACP-az pozitif lenfositlere rastlandı. Medulladaki retikulum hücreleri ile makrofajların diffüz pozitif reaksiyon verdikleri belirlendi (Şekil 44).

Bu dönemde perifer kan lenfositlerinde BG-az pozitivitesi gözlenmemekle birlikte, monositlerde diffüz pozitivite tespit edildi (Şekil 45). Timus kesitlerinde ise tek tek BG-az pozitif lenfosit gözlenirken, retikulum hücreleri ve makrofajların diffüz pozitif reaksiyon verdikleri dikkati çekti (Şekil 46).

### **4.3. Kontrol ve Deney Gruplarında Bursa Fabricii'nin Embriyonal Gelişimi**

#### **4.3.1.Kuluçkanın yedinci günü**

Bu dönemde organ taslağı, son bağırsak kanalının dorsalinde yer alan epitel tomurcuğu halindeydi. Amniyon boşluğundan kloakal plak ile ayrılan organ taslağının merkezi bir lümenine sahip olduğu ve içini döşeyen epitelde intraselüler ve interselüler lokalizasyonlu vakuollerin bulunduğu dikkati çekti. Bu döneme ait kan preparatlarında gözlenen iri bazofilik hücrelere organ taslağının derin mezenkiminde ve yer yer merkezi lümenin içini döşeyen epitelin bazal membranına yakın bölgelerde de rastlandı (Şekil 47).

Organ taslağının histolojik yapısında, kontrol ve deney grupları arasında belirgin fark gözlenmedi.

#### **4.3.2.Kuluçkanın onuncu günü**

Bu dönemde kontrol grubundaki embriyolarda organ taslağının epitel örtüsünün lümenine doğru evagine olarak plikaları şekillendirmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 48).

Epitelin altındaki mezenkimal bölgedeki iri-bazofilik hücrelerin sayısı artmış durumdaydı (Şekil 49).

Deney gruplarından 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii taslaklarında ise plika şekillenmesinin belirgin bir şekilde baskılanmış olduğu ve aynı zamanda epitel altındaki mezenkimal bölgede iri-bazofilik hücrelerin de nispeten daha az sayıda oldukları dikkati çekti (Şekil 50).

#### 4.3.3.Kuluçkanın onikinci günü

Bu dönemde, kontrol gruplarının organ taslaklarında plika oluşumunun tamamlanmış olduğu; iri-bazofilik hücrelerin topluluklar oluşturdukları bölgelerde epitelde yer yer epitel tomurcuklarının şekillenmeye başladığı ve bölge epitel hücrelerinin, bazal yüzlerinde toplanan iri-bazofilik hücrelerin neden olduğu basınçla kısmen yassı oldukları dikkati çekti (Şekil 51). Organ mezenkiminde yer yer eritropoietik ve granülopoietik odaklara da rastlandı.

Deney gruplarından 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii taslaklarında ise henüz epitel tomurcuklarının şekillenmelerinin başlamamış olduğu dikkati çekti (Şekil 52).

Bu dönemde, diffüz tarzda ANAE, ACP-az ve BG-az pozitivitesine sahip olan az sayıdaki monosite, organ taslağının derin mezenkimal bölgelerinde rastlandı. Bununla birlikte aynı bölgelerdeki eritropoietik ve granülopoietik odaklarda bulunan bazı hücrelerde de diffüz pozitive gözlendi.

#### 4.3.4.Kuluçkanın onüçüncü günü

Bu dönemde, epitel tomurcuklarının irileşerek bir yandan lümene doğru belirgin çıkıntılar oluştururken, diğer yandan da alttaki mezenkime invagine oldukları gözlendi. Bu görünümü ile organda lenf folikülü şekillenmesinin histolojik organizasyon aşaması başlamış durumdaydı (Şekil 54). Tomurcukların ortalarındaki bazofilik hücrelerin çepeçevre, son bağırsak endodermi kökenli hücreler tarafından çevrelendiği ve tomurcuğun bazal yüzündeki subnodüler hücrelerin, yüzey epitelinin devamı olan bazal membrana oturdukları dikkati çekti. Gelişmekte olan foliküllerin lümene bakan yüzlerini örten epitel hücrelerinden lümene komşu olanlarının, bazofilik hücre topluluğunun oluşturduğu

basınçla yassılıp dejenere oldukları ve bunların yerini epiteloid karakter kazanan bazofilik hücrelerin aldığı saptandı. İlk kez bu dönemde bazofilik hücre topluluğu içinde lenfosit morfolojisine sahip hücreler gözlemlendi (Şekil 53). Deney gruplarından 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki bursa Fabricii taslağında folikül gelişiminin henüz başlamamış olduğu dikkati çekti (Şekil 55). Bursa Fabricii kesitlerinde yapılan ANAE demonstrasyonu ile elde edilen sonuçlar, onikinci gündekilere büyük benzerlik göstermekte olup; bu bulgulara ek olarak organ mezenkimindeki eritropoietik ve granülopoietik odaklardaki bazı hücrelerde de NaF'a duyarlı diffüz pozitivite tespit edildi.

ACP-az demonstrasyonu sonuçları ise onikinci günde elde edilen bulgularla büyük benzerlik göstermekteydi. Özellikle gelişmekte olan lenfoid foliküllerin merkezi bölgelerindeki lenfosit morfolojisine sahip bazı hücrelerin granüler pozitivite gösterdikleri dikkati çekti (Şekil 56).

Bu dönemde, organ kesitlerinden elde edilen BG-az demonstrasyonu sonuçları, aynı dönemin ACP-az demonstrasyonu sonuçlarına büyük benzerlik göstermekteydi. Organ taslağının mezenkimindeki eritropoietik ve granülopoietik odaklardaki hücrelerin önemli bir kısmı diffüz pozitivite gösterirken; tomurcukların merkezi bölgelerindeki lenfosit morfolojisine sahip az sayıdaki hücrenin granüler pozitivite gösterdikleri tespit edildi.

#### **4.3.5.Kuluçkanın onbeşinci günü**

Bu dönemde, kontrol grubundan alınan organ kesitlerindeki tomurcukların daha iyi organize oldukları ve lenf folikülünün yapısal özelliklerini kazanmaya başladıkları tespit edildi. Ayrıca bu yapıların irileşmiş oldukları da dikkati çekti (Şekil 57). Tomurcukların özellikle merkezi bölgelerinin, organa özgü lenf foliküllerinin medulla bölgelerinin genel histolojik yapı özelliklerini büyük oranda kazanmış oldukları gözlemlendi. Foliküllerin lümene bakan yüzlerini örten ve yassılaştıran epitel hücrelerinin yer yer dejenere oldukları ve bunların yerini epiteloid karakter kazanan mezenkimal hücrelerin alarak folikül ilişkili epitel (FAE)'i oluşturdukları dikkati çekti. Organ bu dönemde, dıştan fibromusküler bir katmanla çevrelenmiş durumdaydı. Bu dönemde de organın bağ dokusunda yaygın granülopoietik odaklara rastlandı. Lenf foliküllerini, oldukça gelişmiş bir retikulum iplikleri ağının çevrelediği tespit edildi (Şekil 58).

Deney gruplarından özellikle 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından elde edilen embriyoların bursa Fabricii'lerinde lenf foliküllerinin gelişiminin belirgin biçimde baskılanmış olduğu dikkati çekti. Bu gruplarda, az sayıda ve epitel tomurcuğu oluşumu aşamasındaki, küçük lenf folikülü taslaklarına rastlandı. Ayrıca bağ dokusundaki yoğun eozinofilik hücre infiltrasyon alanları, deney gruplarında sıklıkla rastlanan bulgulardı (Şekil 59).

Kontrol gruplarının bursa Fabricii kesitlerinde gerçekleştirilen ANAE demonstrasyonunda, NaF'a duyarlı ve diffüz pozitivite gösteren retikulum hücreleri ve makrofajların yanı sıra foliküllerin merkezi bölgelerinde az sayıda ANAE pozitif lenfosit gözlemlendi. Ayrıca bursa Fabricii'nin bağ dokusunda eritropoietik ve granülopoietik odaklarda ve foliküllerin merkezi bölgelerinde az sayıda ACP-az pozitif lenfositlere de rastlandı. ACP-az pozitivitesi interfoliküler epitel (IFE)'i oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarında da gözlemlendi.

Bu dönemde BG-az pozitif lenfositlere, onüçüncü gündekinden daha az sıklıkla rastlandı. BG-az pozitif lenfositler çoğunlukla interfoliküler bağ dokusunda yerleşirken, az sayıdaki BG-az pozitif hücre ise subnodüler epitele yakın konumda lokalize olmuş durumdaydı.

#### **4.3.6.Kuluçkanın onsekizinci günü**

Bu dönemde, organdaki lenf foliküllerinin histolojik gelişimlerinin büyük ölçüde tamamlanmış olduğu ve organın lamina propriyasını tamamen doldurmuş oldukları gözlemlendi. IFE'nin bazal membranının devamı olan bir bazal membran üzerine oturan kortiko-medullar sınır hücrelerinin hemen dışında birkaç sıra lenfositten oluşan folikül korteksinin şekillenmeye başladığı dikkati çekti (Şekil 60). Retiküler iplik boyaması uygulanan kesitlerde, FAE'nin bazal membranının bulunmadığı dikkati çekti (Şekil 61). IFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının PAS ile pozitif reaksiyon verdikleri gözlemlendi. İnterfoliküller bağ dokusunda ve foliküler medullada plazma hücrelerini andıran pironinofilik hücrelere rastlandı.

Deney gruplarından 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii'lerindeki lenf folikülü gelişmesinin baskılanmasına bağlı olarak, lenf foliküllerinin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında oldukça küçük kaldıkları ve interfoliküler bağ dokusunun da nispeten

daha geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 62). Aynı zamanda FAE'nin gelişmesinin tamamlanmadığı, bu epitelin yassı ve dejenere hücrelerden oluştuğu dikkati çekti.

Bu dönemde kontrol gruplarından alınan bursa Fabricii kesitlerinde foliküllerin medulla bölgelerinde sıklıkla ANAE pozitif lenfositlere rastlandığı halde, deney gruplarından 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında ANAE pozitif lenfositlere seyrek olarak rastlandı (Şekil 63).

Kuluçkanın onsekizinci gününde de ACP-az pozitif lenfositlere foliküllerin medullasında rastlandı. Retikulum hücreleri ile makrofajlarda ACP-az pozitif reaksiyon gözlemlendi. Bununla birlikte; önceki dönemlerde granülopoietik ve eritropoietik odaklarda gözlenen ACP-az pozitif hücrelere bu dönemde daha az sıklıkla rastlandı. İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin ise apikal sitoplazmalarında daha önce gözlenen güçlü pozitivite bu dönemde de gözlemlendi. Deney gruplarından 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii kesitlerinde ortaya çıkan gelişme geriliğinin sonucu olarak ACP-az pozitif hücrelere de daha seyrek olarak rastlandı.

Kontrol gruplarında BG-az pozitif lenfositlere bu dönemde sıklıkla, foliküllerin medulla bölgelerinde rastlandı. BG-az pozitivitesi, retikulum hücreleri ile makrofajlarda tespit edildi. Deney gruplarından 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii kesitlerinde BG-az pozitif lenfositlere daha seyrek olarak rastlandı.

#### **4.3.7. Kuluçkadan çıkışın ilk günü**

Bu dönemdeki bursa Fabricii'nin histolojik yapısı, kuluçkanın onsekizinci günündekine oldukça benzemektedir. Bu dönemde de organa özgü lenf folikülleri, organın lamina propriyasını tamamen doldurmuştu (Şekil 64). Foliküllerin kortiko-medullar sınır hücrelerinin dışındaki korteks bölgelerinin önceki dönemdekinden biraz daha genişlemiş olduğu, İFE ve FAE'nin gelişiminin tamamlanmış olduğu tespit edildi (Şekil 65). Foliküllerin medulla bölümlerinde çok sayıda piknotik çekirdekli lenfositler ile bunların yıkımlanması sonucunda oluşan granüler hücre artıklarını fagosite etmiş olan iri makrofajlar gözlemlendi (Şekil 66). İnterfoliküler bağ dokusunda, granülopoietik odaklara bu dönemde de rastlandı. Deney gruplarından 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii'lerindeki lenfoid folliküllerin, kontrol gruplarındakinden daha küçük olmalarının yanı sıra, foliküllerdeki lenfosit topluluğunun az olduğu ve FAE'nin gelişmemiş olduğu da dikkati çekti (Şekil 67). Kontrol gruplarında ANAE pozitif lenfositlere foliküllerin

medullalarında ve az sayıda rastlandı. Aynı zamanda, retikulum hücreleri ve makrofajlar ile İFE'nin epitel hücrelerinin de NaF'a duyarlı ANAE pozitifitesi gösterdikleri saptandı. Deney gruplarından 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii kesitlerindeki foliküler gelişme geriliği yanında, bu yapılarda ANAE pozitif lenfositlere de daha az sıklıkla rastlandı.

ACP-az pozitif lenfositlere, bu dönemde foliküllerin medullalarındaki sıklıkla rastlandı. Aynı zamanda İFE'nin epitel hücrelerinin apikal sitoplazmaları ile retikulum hücreleri ve makrofajların da ACP-az pozitif reaksiyon verdikleri gözlemlendi (Şekil 68). Deney gruplarından 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii'lerinde lenfositlere daha seyrek olarak rastlanması yanında, ACP-az pozitif lenfositlere de seyrek olarak rastlandı.

Bu dönemde BG-az pozitifitesi lenf foliküllerinin medullalarındaki az sayıda lenfositte tespit edildi (Şekil 69). Deney gruplarından 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının bursa Fabricii kesitlerinde folikül gelişiminin baskılanmış olmasının yanında BG-az pozitif lenfositlere de oldukça seyrek olarak rastlandı.

#### **4.3.8.Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta**

Bu dönemde, foliküllerin oldukça irileşmiş ve organın lamina propria ve submukozasını tamamen kaplamış oldukları gözlemlendi. İrileşen lenf foliküllerinin, yan ve altlardan maruz kaldıkları basınca bağlı olarak organa özgü olan lamba şişesi şeklini aldıkları tespit edildi. Özellikle foliküler korteks oldukça genişlemiş durumdaydı (Şekil 70). Belirgin bir bazal membrana sahip olmayan FAE içerisindeki intraepitelyal lenfositlerde de belirgin bir artış göze çarptı (Şekil 72). İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının kuvvetli PAS pozitif reaksiyon verdikleri tespit edildi (Şekil 71). Foliküllerin medullar bölgelerinin periferinde ve özellikle de kortiko-medullar sınıra yakın bölgelerinde gruplar halinde plazma hücrelerine rastlandı.

Bu dönemde kontrol grupları ile deney gruplarının bursa Fabricii'lerinin histolojik yapıları arasında belirgin farklar gözlenmedi.

ANAE pozitifitesi bu dönemde de foliküllerin medullalarındaki az sayıdaki lenfosit ile retikulum hücreleri ve makrofajlarda gözlenirken; İFE'de de diffüz ANAE pozitifitesi saptandı (Şekil 73).

ACP-az pozitifitesi ise İFE'nin epitel hücrelerinde ve medulladaki az sayıdaki lenfosit ile makrofaj ve retikulum hücrelerinde tespit edildi (Şekil 74). BG-az pozitifitesine lenfoid foliküllerin medullalarındaki az sayıdaki lenfositte rastlandı (Şekil 75).

#### **4.4. Kontrol ve Deneş Gruplarında Dalanın Embriyonal Gelişimi**

##### **4.4.1.Kuluçkanın onikinci günü**

Bu dönemde, kontrol grubu hayvanların dalak taslaklarında, çok sayıda hemopoitetik odak ile küçük çaplı arterlerin tunika adventisya katmanlarına infiltre olmuş durumdaki tek tük lenfosit gözlemlendi (Şekil 76). Aynı zamanda gelişmekte olan venöz sinüslerine de rastlandı.

Deneş gruplarından, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının dalak taslaklarında ise hemopoitetik odakların küçük ve az sayıda oldukları dikkati çekti. Ayrıca küçük çaplı arterlerin tunika adventisyalılarında lenfositlere nadiren rastlandı. Venöz sinüsleri şekillendirecek olan venöz damar ağları da daha az gelişmiş durumdaydı (Şekil 77). Bu dönemde dalakta ANAE pozitifitesi gösteren lenfositlere rastlanmadı. Ancak az sayıdaki lenfositte ACP-az pozitifitesi tespit edildi (Şekil 78). Yer yer lenfosit morfolojisine sahip olmayan ve diffüz ACP-az pozitif hücrelere de rastlandı. BG-az pozitif hücreler bu dönemden alınan dalak kesitlerinde gözlemlenmedi.

##### **4.4.2.Kuluçkanın onüçüncü günü**

Kontrol gruplarında arterlerin tunika adventisyalılarına yoğun lenfoid hücre infiltrasyonunun gerçekleştiği bu dönemde, dalağa özgü foliküllerin gelişiminin daha da ilerlemiş olduğu saptandı (Şekil 79 ve 80).

Deneş gruplarından 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında, dalaktaki lenf folikülü gelişiminin önemli oranda baskılanmış olduğu ve küçük çaplı arterlerin tunika adventisyalılarına az sayıdaki lenfoid hücrenin infiltre olduğu dikkati çekti (Şekil 81).

Bu dönemde de, dalak kesitlerinde ANAE pozitifitesi gösteren lenfositlere rastlanmadı. ACP-az bulguları, önceki dönemdeki bulgularla büyük benzerlik



göstermekteydi (Şekil 82). Dalakta, BG-az pozitifitesi gösteren lenfositlere ilk kez bu dönemde rastlandı (Şekil 83).

Deney gruplarından 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının dalaklarında ise gerek ACP-az ve gerekse de BG-az pozitif lenfoid hücrelere de daha az sıklıkla rastlandı.

#### 4.4.3.Kuluçkanın onbeşinci günü

Bu dönemde dalağın histolojik organizasyonundaki ilerlemeye paralel olarak lenf foliküllerinin gelişiminin biraz daha ileri aşamada olduğu dikkati çekti. Küçük arterlerin tunika adventisyalarına yoğun bir şekilde lenfositler infiltre olmuş durumdaydı.

Deney gruplarından 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında dalağın histolojik organizasyonunun baskılanmış olduğu ve küçük arterler etrafındaki lenfosit infiltrasyonunun daha zayıf olduğu dikkat çekti.

ANAE pozitifitesi gösteren lenfositlere dalakta bu dönemde de rastlanmamakla birlikte, diffüz pozitive gösteren retikulum hücreleri ve makrofajlara ilk kez bu dönemden alınan doku kesitlerinde rastlandı. ACP-az pozitifitesi bulguları onüçüncü gündekine büyük benzerlik göstermekteydi. BG-az pozitif lenfositlere, dalak kesitlerinde bu dönemde de rastlandı.

Deney gruplarından 20 ve 40 ng gruplarından alınan dalak kesitlerinde ACP-az ve BG-az pozitif lenfositlere daha seyrek olarak rastlandı

#### 4.4.4.Kuluçkanın onsekizinci günü

Dalaktaki kırmızı ve beyaz pulpa ayrımının kısmen de olsa yapılabildiği ve lenf foliküllerinin histolojik organizasyonunun ilerlemiş olduğu gözlemlendi (Şekil 84). Organ stromasındaki retiküler iplik ağının ileri derecede organize durumda olduğu ve arteriya sentralisler'le arteriya trabekülaris'lerin tunika adventisyalarındaki retiküler iplik ağıyla bağlantılı olduğu tespit edildi (Şekil 85). Plazma hücrelerine benzer morfolojiye sahip olan iri-pironofilik sitoplazmalı hücrelere de bu dönemde rastlandı (Şekil 86).

Deney gruplarından ise 10 ve 20 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında, dalaktaki lenf folikülü gelişiminin belirgin olarak baskılanmış olduğu tespit edildi (Şekil 87).

Dalakta ilk kez bu dönemde az sayıda ANAE pozitif lenfositte rastlandı (Şekil 88). Az sayıda ACP-az ve BG-az pozitifitesi gösteren lenfositler de bu dönemki dalak kesitlerinde gözlemlendi.

#### **4.4.5.Kuluçkadan çıkışın ilk günü**

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde dalağın histolojik organizasyonu hemen hemen tamamlanmış durumdaydı. Bu dönemde lenfoid dokunun, lenf folikülleri ile lenfatik kordonlardan oluştuğu ve foliküllerin merkezi bölgelerinin biraz daha soluk boyandıkları tespit edildi (Şekil 89). Pironinofilik sitoplazmalı hücrelere bu dönemde daha sıklıkla rastlandı. Deney gruplarından, 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> grubundaki dalak kesitlerinde lenf folikülü gelişiminin belirgin biçimde baskılanmış olduğu ve foliküllerin daha küçük olup; ortalarında soluk boyanan bölgelerin bulunmadığı saptandı (Şekil 90).

İlk kez bu dönemdeki dalak kesitlerinde ANAE pozitifitesine sahip lenfositlere a. sentralis etrafında rastlandı (Şekil 91). ACP-az pozitif lenfositler ise özellikle folikülün merkezi bölgelerinde lokalize olmaktadır. BG-az pozitifitesi ise az sayıdaki makrofaj ve retikulum hücrelerinin yanı sıra, oldukça az sayıdaki lenfositte gözlemlendi ve bu lenfositler organ içerisinde dağınık bir yerleşime sahiptiler.

Deney gruplarından 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından alınan dalak kesitlerinde histolojik organizasyonun baskılanmış olması ve folikül gelişiminin gecikmiş olması yanında, organda gerek ANAE, gerek ACP-az ve gerekse de BG-az pozitifitesine sahip hücrelere daha seyrek olarak rastlandı.

#### **4.4.6.Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta**

Bu dönemde dalak histolojik ve fonksiyonel gelişimini tamamlamış durumda ve aktif olarak fonksiyon gören bir perifer lenfoid organ yapısına sahipti. Foliküllerde eksentrik yerleşimli arteriya sentralis ile bunu saran lenfoid hücre manşonu (Periarterioler lymphoid sheath, PALS), sentrum germinativum'a komşu konumda gözlemlendi. Venöz sinuslar kan hücreleriyle dolu durumdaydı (Şekil 92). Foliküllerin çatısını oluşturan retikulum iplikleri a. sentralis'in tunika adventisyasındaki ipliklerle bağlantılıydı (Şekil 93). Subkapsüler bölgelerde, sentrum germinativumlarda ve yer yer de damarların çevresinde gruplar halinde, çok sayıda plazma hücresi göze çarpıyordu (Şekil 94).

Deney gruplarının dalak dokularının histolojik yapısı, kontrol gruplarınıninkilerle büyük benzerlik göstermekteydi. ANAE pozitif lenfositlerin çoğunlukla arteriya sentralis etrafındaki PALS'ta lokalize oldukları tespit edildi (Şekil 95). Bu hücelere lenfatik kordonlarda da sıklıkla rastlandı. Diffüz pozitivite gösteren retikulum hücreleri ve makrofajların ise lenfatik kordonlarda, sentrum germinativum sınırlarında ve sinus duvarlarında lokalize oldukları dikkati çekti. ACP-az pozitivitesi ise retikulum hücreleri ve makrofajlarda gözlenirken, bu enzim pozitivitesine sahip lenfositlerin lenf folikülleri ve lenfatik kordonlarda düzensiz dağılım gösterdikleri gözlemlendi. A.sentralis etrafında ACP-az pozitif lenfositlerin bulunmadığı dikkati çekti (Şekil 96). BG-az pozitivitesi ise bu dönemde özellikle retikulum hücresi ve makrofajlarda gözlemlendi. Az sayıda BG-az pozitivitesine sahip olan lenfositin ise dalakta düzensiz lokalizasyon gösterdikleri dikkati çekti (Şekil 97).

Deney grupları ile kontrol gruplarının enzim pozitiviteleri arasında belirgin farklar gözlemlenmedi.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yem ve yem hammaddelerinde bulunan aflatoksinler, ülkemiz hayvancılığına önemli ekonomik kayıplar verdirmeleri yanında, hayvansal ürünlere geçebildiklerinden halk sağlığını da tehdit etmektedir. Zira aflatoksinler bilinen en güçlü hepatokarsinojenlerdendir (Eser ve ark 1978, Hamilton 1982).

Tavukçuluk sektöründe ise, yemdeki aflatoksinler birden fazla aşamada etkilerini göstermektedirler. Gerek yedirme denemeleri ve gerekse de saha taramaları, yemlerde bulunan aflatoksinin önemli bir kısmının kanatlı dokularına ve yumurtaya geçebildiğini ortaya koymaktadır. Ağaçdelen ve Acet (1993), 500 µg/gün/tavuk dozunda AFB<sub>1</sub> alabilecekleri dozda AFB<sub>1</sub> içeren yemle 1 hafta süresince besledikleri tavukların yumurtalarında AFB<sub>1</sub> içeren yemin kesilmesinden sonraki 3-7. günler arasında 0,0013-0,177 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> tespit etmişlerdir. Oliveira ve ark (2000), 8 hafta boyunca 500 µg/kg AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri tavukların yumurtalarında ortalama 6 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> tespit ettiklerini bildirirken, Jacobson ve Wiseman (1974) ise 0,1 ppm düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri tavukların yumurtalarında 10. günde 9 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> tespit etmişler, Sudhakar (1992) ise 600 ppb düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 5 ng/g yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub>'e rastladığını bildirmektedir. Bu oranlar dikkate alınarak yapılan hesaplamalar yemlerdeki aflatoksinlerin 1/2000-1/2500 oranında yumurtaya geçtiğini ortaya koymaktadır.

Ülkemizde yumurtacı tavuk yemlerinde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 20 ppb olduğu (Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Tebliği 1997) dikkate alınarak, günde 130 gr yem tüketen ve gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında bulunması muhtemel AFB<sub>1</sub> miktarının 2,6 ng olduğu hesaplanmıştır (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a). Ayrıca, bildirilen limitlerin aşıldığı da bilinen bir olgudur. Nitekim Tuncer (1987), Ankara'da tüketime sunulan yumurta örneklerinde 120 ng/yumurta düzeyine ulaşan AFB<sub>1</sub> tespit etmiştir. Yumurtaya geçen aflatoksinlerin büyük çoğunluğunun AFB<sub>1</sub>'in aktif metabolitlerinin olduğu dikkate alındığında olayın ciddiyeti artmaktadır. Jelinek ve ark (1985)'nin Tavuk Embriyotoksiste Testi-I (Chicken Embryotoxicity Screening Test-I, CHEST-I) ile total aflatoksin için tavuk embriyolarında belirlemiş oldukları embriyotoksik doz sınırları 0,3-30 ng/yumurta iken, teratojenik doz sınırı 3-30 ng/yumurta'dır. Bu durumda yemlerde bulunmasına izin verilen aflatoksin

düzeylerinin bile kanatlı sektöründe önemli problemlere yol açması muhtemeldir. Zira Jelinek ve ark (1985)'nin belirlemiş oldukları embriyotoksik doz sınırlarındaki toksin dozları %33 oranında mortaliteye neden olmaları yanında, aynı zamanda %12 oranında kalp anomalilerine, % 4 oranında da vücut duvarı anomalilerine yol açmaktadırlar.

Bu çalışmada da 4 farklı AFB<sub>1</sub> dozu uygulanmış olup, doz artışıyla birlikte, embriyonik mortalitenin de arttığı tespit edilmiştir. Her ne kadar 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki embriyonik ölüm oranları (infertilite hariç) sırasıyla %41,66 ve %43,47 olarak bulunmuş ve bu iki grubun mortaliteleri arasındaki fark önemsiz ( $p>0,05$ , Tablo 4.1) olmakla birlikte, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında sırasıyla %80,43 ve %91,22 gibi oldukça yüksek mortalite değerleri saptanmıştır. Her iki grubun mortaliteleri diğer gruplarından önemli ( $p<0,05$ ) oranda yüksektir (Tablo 4.1). Solvent olarak kullanılan %30'luk etanol (ETOH) grubundaki mortalite ise %20,25 olup, Çelik ve ark (2000a)'nın bildirdikleri %11,11'lik mortaliteden yüksek olmakla birlikte, Prelusky ve ark (1987)'nin bildirdiği %20,8'lik mortalite değerine oldukça yakındır. Sadece delinip-kapatılan gruptaki (Kontrol-2) mortalite %7,89 iken, hiçbir işlem uygulanmayan grupta mortalite %1,204 olarak bulunmuştur. Bu iki ortalama mortalite değerleri arasındaki farkın önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Bu da embriyonal gelişmenin erken evrelerinin oldukça kritik olduğunu ve aflatoksinler gibi yumurtadaki muhtemel toksik unsurların yanında diğer dış faktörlerin embriyonal gelişme üzerinde önemli zararlı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Çelik ve ark (2000a), hava kamarasına 20 $\mu$ l'den daha fazla hacimdeki test solüsyonu enjeksiyonunun, yumurta içi basıncı artırarak embriyonik ölümlere neden olabileceğini ve bu durumun da test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini vurgulamakla birlikte; daha önceki hiçbir çalışmada, yumurtaya uygulanan delip-kapama işleminin neden olacağı mortalite üzerinde durulmamıştır.

İlaç ve diğer kimyasal maddelerin olduğu gibi aflatoksinlerin de embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla tercih edilen materyallerden biridir (Stoloff ve ark 1972). Jelinek (1977), dömlü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksitesisi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak adlandırılan bir metot geliştirmiş ve bu metot daha sonra yapılan bir çok embriyotoksitesite ve teratojenite çalışmasında da uygulanmıştır. Embriyolu tavuk yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonuçları memelilere de uyarlanabilmektedir. Çünkü CHEST ile belirlenen toksik dozun sulandırma

konsantrasyonunun  $10^{-2}$  ile çarpılmasıyla elde edilen değer, gebe memelilerde annenin canlı ağırlığının kg'ını başına alması gereken toksik doz olarak kabul edilmektedir (Jelinek 1977). Test kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta; canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalar ile Hayvan Haklarını Koruma Kanununa da aykırı düşmemektedir (Jelinek ve ark 1985, Veselý ve Veselá 1991). Kemper ve Luepke (1986) de belirtilen nedenlerle Tavuk Yumurta Testi (Hen's Eggs Test-HET) olarak da adlandırılan bir test geliştirmişler ve söz konusu testle elde edilen sonuçların memelilerde yapılan toksisite sonuçları ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Tavuk Embriyotoksisite Belirleme Testinin geliştirilmesi amacıyla yapılmış olan çalışmalarda hem yumurtaya enjeksiyon yerinin (maddenin veriliş yolunun) ve hem de embriyonun yaşının (enjeksiyon döneminin) optimize edilmesine çalışılmıştır. Kucera ve Burnand (1987) kanatlı embriyosunun, insan embriyosunun fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı en duyarlı olduğu 2-5. haftalar arasına karşılık gelen ilk 3 günlük periyodunun toksisite çalışmaları için uygun bir dönem olacağını bildirirlerken, Jelinek ve ark (1985) ile Prelusky ve ark (1987) ise test edilen maddenin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşacak metabolitlerinin etkilerinin de belirlenmesinin amaçlandığı durumlarda daha geç dönemlerdeki (daha ileri yaşlardaki) embriyoların kullanılması gerektiğine dikkati çekmektedirler. Zira Jelinek ve ark (1985), enjeksiyon için aflatoksinin metabolize olmamış haldeki embriyotoksik doz sınırlarını belirleyebilmek amacıyla inkübasyonun yaklaşık 40. saatini seçtikleri halde (CHEST-I), bu maddelerin neden olacağı malformasyonları ve organ affinitesini (teratojenik etkilerini) belirlemek amacıyla da inkübasyonun 2, 3 ve 4. günlerinde enjeksiyonu tercih etmişlerdir (CHEST-II). Burada dikkat edilmesi gereken husus, bazı maddelerin metabolitlerinin toksik özellik kazanmaları nedeniyle, erken, yani karaciğerin fonksiyonel aktivitesinin başlamadığı dönemde yapılacak enjeksiyonların yanlış negatif sonuçlara (false negative results) yol açabilmesidir. Çünkü, teratojenite ve embriyotoksisite çalışmalarında yanlış negatif sonuçlar, her zaman için yanlış pozitif sonuçlardan çok daha tehlikelidir (Johnson 1986). Bu çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in metabolize olmamış yani doğal (intact, native) formunun embriyotoksisitesinin belirlenmesi amaçlandığından, inkübasyon öncesi dönemdeki enjeksiyon tercih edildi. Bu enjeksiyon döneminde belirlenen mortaliteler ve embriyonik

ölümlerin Hamburger-Hamilton (1951) skalasına göre dönemlere dağılımları önceki araştırmacıların (Verret ve ark 1964, Çelik ve ark 2000a) sonuçlarıyla büyük benzerlik göstermektedir. Verret ve ark (1964), inkübasyon öncesi yapılan AFB<sub>1</sub> enjeksiyonunun maksimum mortaliteye neden olduğunu ve ölümlerin ilk 8 günde yoğunlaştığını ileri sürmekle birlikte; Çelik ve ark (2000a) ölümlerin inkübasyonun ilk 7 günü içerisinde yoğunlaştığına dikkati çekmişlerdir. Bu çalışmada da embriyonik ölümlerin ilk 7 gündeki embriyonik gelişme evrelerinde yoğunlaştığı ve dozdaki artışa bağlı olarak erken embriyonik ölümlerin de arttığı tespit edildi (Grafik 4.2). Bu durum, mitoz bölünme ve hücre farklılaşmasının son derece hızlı olduğu erken embriyonik gelişme evrelerinde, embriyonun fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı son derece duyarlı olmasıyla açıklanabilir (Kucera ve Burnand 1987). Zira bu dönemde tavuk embriyosu blastula aşamasında olup, embriyonal disk sahasında şeffaf bir bölge halindeki area pellucida ile bunu çevreleyen area opaca'dan oluşmaktadır (Etches 1996). Özellikle 20 ve 40 ng/yumurta dozunda AFB<sub>1</sub> verilen yumurtaların bazılarında area opaca hücrelerinin aşırı üreyerek; yumurta sarısının ekvatoryal düzlemine doğru yayılan yüzük şeklinde bir hücre topluluğu oluşturdukları ve bunun da periferden area pellucida'ya yaptığı basınca bağlı olarak bölgenin dışarıya doğru fitiklaşmış olduğu dikkati çekti. Area opaca hücrelerinin oluşturduğu bu hücresel yüzük bölgesinden alınan kesitlerde, area opaca'yı oluşturan hücreler oldukça belirgin bir şekilde ayırt edilebilmekteydi. Çok erken embriyonal gelişme dönemindeki hücre transformasyonundaki bir bozukluğa sebep olabileceği düşünülen benzeri anormal embriyonal gelişme Çelik ve ark (2000a) tarafından da bildirilmiştir.

AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda embriyonun yaşındaki artış ile birlikte toksine direncinin de arttığı belirlenmiştir. Nitekim Prelusky ve ark (1987) inkübasyonun 5. gününde yapılan enjeksiyonlarda mortalitenin %50 olduğu halde, 7. günde yapılan enjeksiyonlarda bu oranın %38 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, Çelik ve ark (2000a)'nın yapmış oldukları çalışmada bildirdikleri mortalite değerlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Nitekim araştırmacılar (Çelik ve ark 2000a) inkübasyon öncesi yapılan enjeksiyonu takip eden ilk 7 gün boyunca mortalite değerlerini total aflatoksinin 100 ng/yumurta dozu için %90, AFB<sub>1</sub>'in 100 ng/yumurta dozu için ise %98 olarak bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından elde edilen mortalite değerleri sırasıyla %80,43 ve %91,22 olarak bulunmuş olup, ölümlerin büyük bir çoğunluğunun erken embriyonik gelişme dönemlerinde gerçekleştiği dikkati çekmiştir.

Embriyotoksisite çalışmalarında, test edilecek maddelerin yumurtaya verilme yollarının güvenilirliği üzerinde farklı görüşler ileri sürülmektedir. Prelusky ve ark (1987), AFB<sub>1</sub>'i yumurtaya 4 farklı bölgeden (hava kamarasına, 45°'lik açı ile albümine, ekvator bölgesinden albümine ve yumurta sarısına) enjekte etmişler ve AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksisitesinde enjeksiyon bölgesine bağlı belirgin bir farklılık gözlemediklerini bildirmişlerdir. Verret ve ark (1964) ise yumurta sarısına yapılan enjeksiyonun, hava kamarasına yapılan nazaran daha az toksik etkiye sahip olduğunu, ÖD<sub>50</sub> değerlerinin yumurta sarısına yapılan enjeksiyonda 48 ng/yumurta iken, hava kamarasına enjeksiyonda 25 ng/yumurta olduğunu tespit etmişlerdir. Buna karşın uygulama kolaylığı, sterilizasyon işleminin kolayca gerçekleştirilebilmesi, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olmasının yanı sıra, diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basıncındaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için bir çok çalışmada hava kamarasına enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Çelik ve ark 2000a). Yukarıdaki bilgiler dikkate alınarak, bu çalışmada da test solüsyonların enjeksiyonları hava kamarası yoluyla gerçekleştirilmiştir.

İn ovo embriyotoksisite testlerinde; kullanılan çözücü maddenin (solvent) türü, test solüsyonunun hacmi, konsantrasyonu, belirlenecek dozlar ve her doz için kullanılacak yumurta sayısı da önemlidir. Propilen glikol (Stoloff ve ark 1972) ve kloroform (Verret ve ark 1964) da kullanılmış olmakla birlikte, AFB<sub>1</sub> için en sık kullanılan çözücü etanol (ETOH)'dür (Prelusky ve ark 1987, Çelik ve ark 2000a). Söz konusu çözücü için ideal konsantrasyonun ise steril bidistile su ile sulandırılmış %30'luk solüsyonu olduğu bildirilmektedir. Prelusky ve ark (1987)'nin yapmış oldukları bir çalışmada 20µl hacmindeki %30'luk ETOH'un mortalite değerinin %20,8 iken aynı hacimdeki %95'lik ETOH'un mortalite değerinin %43,1 olduğu tespit edilmiştir. Yumurta enjekte edilen test solüsyonunun hacmi çeşitli çalışmalarda 20-100 µl arasında önerilmiş olmakla birlikte (Verret ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986), ideal hacmin hava kamarasına yapılacak olan enjeksiyonlar için 20 µl olduğu bildirilmektedir (Prelusky ve ark 1987, Çelik ve ark 2000a). Prelusky ve ark (1987)'nin yapmış oldukları bir çalışmada %30'luk ETOH'un 20 µl'lik hacminin neden olduğu mortalitenin %20,8 iken, aynı solüsyonun 100 µl'lik hacminin neden olduğu mortalitenin %59,7 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, hava kamarası yoluyla 20 µl'lik %30'luk ETOH'un enjekte edildiği gruptaki mortalite %20,25 olup; bu değer Prelusky ve ark (1987)'nin %20,8'lik mortaliteye oldukça yakındır.



Bir maddenin embriyotoksitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda, test edilecek maddenin farklı dozları denenmelidir. Verret ve ark (1964) her solüsyon için en az 2 farklı doz uyguladıkları halde, Brown ve ark (1986) en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmektedirler. Jelinek (1977) ise etkili dozun belirlenmesinde etkisiz en yüksek doz ile etkili en düşük doz arasındaki dozların denenmesi gerektiğini ileri sürmektedir. Daha önce aflatoksinlerin embriyotoksik dozları belirlendiğinden; aflatoksinlerin embriyonik ölümlerin dağılımları ile immün sistem organlarının gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlendiği bu çalışmada ise yumurtaya geçiş oranları da dikkate alınarak 5, 10, 20 ve 40 ng/yumurta olmak üzere 4 farklı AFB<sub>1</sub> dozu kullanıldı. Aynı zamanda hiçbir işlem uygulanmayan Kontrol-1 grubu ve delinip-kapatılan yumurtalardan oluşan Kontrol-2 grubu ile çözücünün toksisitesini belirlemek amacıyla ETOH grupları da oluşturuldu.

Sonuçların güvenilirliği açısından her doz grubu için kullanılan yumurta sayısı da oldukça önemlidir. Bazı araştırmacılar (Verret ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986, Prelusky ve ark 1987) her grupta en az 20 yumurta kullanılmasını önerirken; Çelik ve ark (2000a) 56'şar, Jelinek ve ark (1985) 120'şer, Kucera ve Burnand (1987) ise 150'şer yumurta kullanmışlardır. Bu çalışmada da her grupta kullanılan yumurta sayısı 80-120 arasındadır.

Aflatoksinlerin etki mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Genel olarak DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek etkilerini gösterdikleri bildirilen aflatoksinlerden en güçlü toksisiteye sahip olan AFB<sub>1</sub>'in metabolizma ürünlerinin daha etkili olduğu ileri sürülmektedir (Meneghini ve Schumacher 1977, Jeffery ve ark 1984). Özellikle karaciğer kökenli karma fonksiyonlu monooksijenaz enzim sistemlerinin (Mix Function Oxygenase, MFO), sitokrom p-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimlerinin etkisiyle oluşan AFB<sub>1</sub>-8,9 oksit'in DNA'daki N<sup>7</sup> guanin'e bağlandığı ve karsinogenik etkinin bu şekilde ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kärenlampi 1987, Benasutti ve ark 1988, Geissler ve Faustman 1988, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a, Mayura ve ark 1998). Ancak, kanatlı embriyosunda bu tip bir metabolik reaksiyonun gerçekleşmesi karaciğer ve böbreklerin fonksiyonlarının aktive olduğu, embriyonal dönemin 5-6. günlerinden sonra mümkündür (Hamilton ve ark 1982). Gerek bu çalışmada, gerek Çelik ve ark (2000a)'nın yapmış oldukları çalışma ile Verret ve ark (1964)'nın yaptıkları çalışmalarda AFB<sub>1</sub>, yumurtalara kuluçkanın başlangıcında enjekte edilmiştir.

Dolayısıyla bu kadar erken dönemde AFB<sub>1</sub>'in metabolizasyonu söz konusu değildir. Ancak buna rağmen elde edilen yüksek mortalite değerleri, AFB<sub>1</sub>'in herhangi bir metabolik aktivasyona uğramadan da güçlü bir embriyotoksik etkiye sahip olduğunun ortaya konulması bakımından önemlidir ve bu durum doğal koşullara da oldukça yakındır.

AFB<sub>1</sub>'in metabolize olmamış formunun embriyonal hücreler üzerindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, Çelik ve ark (2000a) tarafından tanımlanan ve bu çalışmada da karşılaşılan embriyonal disk anomalisi, metabolize olmamış AFB<sub>1</sub>'in embriyonal hücreler üzerindeki etki mekanizması hakkında bazı ip uçları vermektedir. Aşırı üreyen area opaca hücrelerinin area pellucida'yı periferden sıkıştırarak fitikleşmesine neden olmasının yanında area pellucidada, adacıklar halinde hücre gruplarının bulunması, embriyonal dönemin erken dönemlerinde verilen metabolize olmamış AFB<sub>1</sub>'in sitotoksik etkisinden ziyade, hücre farklılaşması üzerinde etkili olabileceğini akla getirmektedir (Çelik ve ark 2000a).

Aflatoksinlerin immün sistem üzerindeki etki mekanizmaları hakkında oldukça farklı görüşler ileri sürülmektedir. Serum protein seviyesi ve sıvısal bağışıklıkta önemli yetmezliklerle sonuçlanan antikor seviyelerindeki düşümlere şiddetli karaciğer hasarının neden olduğu kabul edilmektedir (Campbell ve ark 1983, Sorenson ve ark 1986, Reddy ve ark 1987, Ghosh ve ark 1990, Jonauskienė ve ark 1998). Aflatoksinler aynı zamanda hücre savunma sistemini de baskılamaktadırlar (Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a). Özellikle düşük dozlarda alınan aflatoksinler makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinde önemli yetmezlikler oluşturmaktadırlar. Nitekim, Neldon-Ortiz ve Qureshi (1992a), AFB<sub>1</sub>'in tavukların peritoneal makrofajlarının fagositik aktivitelerinde önemli düşümler meydana getirdiğini, bu düşümlerin MFO'ların varlığında daha da belirgin bir hale geldiğini tespit etmişlerdir. Embriyonal dönemde maruz kalınan AFB<sub>1</sub>'in kuluçkadan çıkışı takip eden dönemde, mononükleer fagositik sistem hücrelerinin fonksiyonlarını baskıladığı da aynı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992b). Çelik ve ark (1996)'da yine benzer şekilde aflatoksinin kanatlılarda peritoneal makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerini önemli oranda baskıladığını tespit etmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (Meneghini ve Schumacher 1977, Jeffery ve ark 1984) AFB<sub>1</sub>'in immün sistemin fonksiyonlarını baskılayıcı etkisini bu maddenin hücrelerdeki protein sentezini baskılamasıyla açıklamaktadırlar. Nitekim AFB<sub>1</sub>'in gerek metabolize olmamış

formu ve gerekse de karaciğerde metabolize olması sonucunda oluşan metabolitleri, DNA ve RNA'ya bağlanarak RNA-polimeraz enzimini inhibe etmektedirler. Bunun sonucu olarak protein sentezinin aksaması, lenfoid sistem hücrelerinin çoğalıp farklılaşmasını olumsuz yönde etkilemesi yanında, immün sistem hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan sitokinlerin sentezini de baskılamaktadır (Dugyala ve Sharma 1996).

Yemlerle alınan aflatoksinler, lenfoid organlarda patolojik bozukluklara da neden olmaktadır. Özellikle kemik iliği, dalak ve timus ile kanatlılarda bursa Fabricii'de meydana gelen patolojik bozukluklara bağlı olarak total lenfosit sayılarında oluşan düşüşler, aflatoksinlerin immüno-supressif etkilerinin ortaya çıkışından sorumlu tutulmaktadır (Campbell ve ark 1983, Slowik ve ark 1985, Mohiuddin ve ark 1986, Cukrova ve ark 1991). Total lenfosit sayılarında meydana gelen düşüşler özellikle T-lenfosit sayılarındaki düşüşlerden kaynaklandığından; bu durum, aflatoksinlerin hücre sel bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Reddy ve Sharma 1989, Ghosh ve ark 1990, Ghosh ve ark 1991, Çelik ve ark 2000b). Yapılan bu çalışmada tavuklarda T-lenfositler için spesifik olan alfa naftil asetat esteraz (ANAE) (Maiti ve ark 1990) ile tavukların B-lenfositlerinde spesifik olarak bulunduğu bildirilen (Graczyk 1984, Graczyk 1987, Slowik ve ark 1990) asit fosfataz (ACP-az) içeren lenfositlerin perifer kandaki oranları belirlendi (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarına ait civcivlerin perifer kanlarındaki lenfosit oranları ile ANAE pozitif lenfosit oranları, kontrol gruplarınınkinden önemli derecede ( $p < 0,05$ ) düşük bulunmuştur (Tablo 4.3). 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki hayvanlarda gözlenen bu düşüş, AFB<sub>1</sub>'in timusun embriyonal gelişimini baskılaması sonucu, hayvanların hücre sel savunma sistemindeki gelişmenin gerilemesiyle açıklanabilir. ACP-az pozitif lenfosit oranları ise 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının her ikisinde de, kontrol grubununkilere oldukça yakındır (Tablo 4.2). Dördüncü hafta sonunda ise hem 5 ng ve hem de 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarının gerek lenfosit oranları ve gerekse de ANAE pozitif lenfosit oranlarının kontrol grubununkilere yakın düzeylerde olduğu ve grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önemli olmadığı ( $p > 0,05$ ) tespit edilmiştir. Bu da kuluçkadan çıkışta T- ve B-lenfosit oranlarında gözlenen düşüşlerin kuluçka sonrasındaki 4 haftalık sürede telafi edilebildiğini akla getirmekteyse de, bu çalışmada immün sistemin fonksiyonları belirlenmemiş olduğundan hayvanların hastalıklara karşı dirençlerinde bir iyileşme olup olmadığı konusunda kesin bir yargıya varmak imkansızdır. Fakat et tavukçuluğu sektörünün günümüzdeki durumu dikkate alındığında, 5 haftalık sürede kesilen hayvanların, besleme döneminin önemli bir

bölümünde düşük T-lenfosit düzeyleriyle yaşamlarını sürdürdükleri ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, immün sistem hücrelerinin sayısal yeterlilikleri yanında fonksiyonel kapasiteleri de önemlidir. Nitekim Qureshi ve ark (1998)'nin bir çalışmasında 10 ppm aflatoksin içeren yemle beslenen broyler anaçların yumurtalarından elde edilen civcivlerin, peritoneal makrofajlarının sayısal olarak yeterli olduğu; ancak bu hücrelerin fagositik kapasitelerinin önemli oranda düşüş olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada timus kesitleri üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, kuluçkanın onuncu gününe kadarki dönemde kontrol-1, kontrol-2, % 30'luk ETOH, 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında timusun embriyonal gelişiminin Sandıkçı ve Çelik (2000)'in bulgularıyla uyumlu bir biçimde, normal seyir takip ettiği gözlemlendi. Aynı gruplarda bursa Fabricii'nin gelişiminin de kontrol grubundakilere benzer bir seyir izlediği ve bulguların Kocaöz ve ark (1997a) ile Dönmez ve Çelik (1998)'in bulguları ile uyumlu oldukları tespit edildi. Ancak 10. günden sonraki embriyonal gelişme evrelerinde hem timus ve hem de bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimlerinin kontrol gruplarına nazaran belirgin bir şekilde geri kalmış olduğu dikkati çekti. Özellikle 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki embriyolara ait timus taslağının oldukça atrofik olduğu; 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında ise bursa Fabricii'nin gelişiminin de baskılanmış olduğu, bu dönemde oldukça ileri safhada olması gereken plika şekillenmesinin henüz başlamamış olduğu dikkati çekti. Çelik ve ark (2000a) da 100 ng/yumurta dozunda total aflatoksin ve AFB<sub>1</sub> verdikleri yumurtalardan elde ettikleri embriyolarda benzer bulgular elde etmişlerdir. Embriyonal dönemin 12, 13, 15 ve 18. günlerinde de dalak, bursa Fabricii ve timusun gelişimi, özellikle 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında belirgin bir şekilde baskılanmış durumdaydı. Bursa Fabricii'de, epitelyal tomurcuk oluşumu ve folikül gelişiminin baskılanmış olduğu dikkat çekiciydi. Bursa Fabricii'de tespit edilen söz konusu bulguların kandaki lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif hücre oranlarındaki düşüşlerle paralellik göstermesi, AFB<sub>1</sub>'in humoral immün sistemin gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkisinin morfolojik kanıtlarından biri olarak kabul edilebilir. Çünkü ACP-az pozitif lenfositler çoğunlukla bursa Fabricii kökenli olup (B-lenfositleri); antikör sentezleyen plazma hücrelerine dönüşürler (Jain 1993). Slowik ve ark (1990), neo-natal dönemde bursektomize ettikleri civcivlerin dalaklarındaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerinde, ACP-az pozitif lenfosit yoğunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, kuluçkadan çıkıştan hemen sonra bursektomize edilen (Graczyk 1984, Graczyk 1987), ya da anti-bursa serumu verilen civcivlerin (Graczyk 1994) hem perifer kanlarındaki ACP-az pozitif lenfosit oranları ve hem de koyun eritrositlerine karşı

üretileen antikor seviyesi ile dalaktaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki ACP-az pozitif lenfosit yoğunluğunun önemli oranda azalmış olduğu ortaya konulmuştur (Slowik ve ark 1990). Bu çalışmada da kuluçkadan çıkışın ilk gününde 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından elde edilen civcivlerin dalak dokularındaki lenf foliküllerindeki germinal merkezlerin, kontrol gruplarındakilerden daha az gelişmiş oldukları dikkati çekti. Sonuç olarak bursa Fabricii'deki lenfosit yapımını (B-lenfosit olgunlaşmasını) baskılayan aflatoksinler, bursa Fabricii'de gelişme geriliğine neden olmaları yanında, dalaktaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki ACP-az pozitif lenfositlerin yoğunluklarında da belirgin azalmalara neden olmaktadır. Bu bulgu, yumurtaya geçen aflatoksinlerin böyle yumurtalardan çıkan civcivlerin antikor yanıtında neden olduğu düşüşlerin (Giambone ve ark 1978, Jonauskiene ve ark 1998) mekanizmasının açıklanmasında önemli yapısal ve morfolojik bilgiler sağlamaktadır.

Bu çalışmada, embriyonal dönem boyunca lenfosit morfolojisine sahip hücrelerde, demonstrasyonu yapılan enzimlerin ortaya çıkış sıraları, Basso ve ark (1980)'nın insan timositlerinde saptamış oldukları sıralamaya büyük benzerlik göstermektedir. Tavuk embriyolarının perifer kan lenfositlerinde embriyonal dönem boyunca ilk olarak asit fosfataz (ACP-az), ardından beta glukuronidaz (BG-az) ve son olarak da alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pozitiviteyi tespit edilmiştir. Ancak Basso ve ark (1980) BG-az pozitivite oranının insanlarda T-lenfosit olgunlaşması ile birlikte düzenli bir şekilde arttığını bildirmektedirler. Bu çalışmada ise BG-az yalnızca embriyonal dönemin 13. gününe ait kan frotilerindeki lenfositlerde gözleendiği halde, daha sonraki dönemlerde sadece monosit morfolojisine sahip olan hücrelerde pozitivite saptanmıştır. Doku kesitlerinde ise kuluçkanın 12 ve 13.günlerinde, az sayıdaki lenfositte, çoğunlukla da timus ve dalaktaki makrofajlarla retikulum hücrelerinde ve bursa Fabricii'de interfoliküler epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarında gözleendi. Kuluçkanın 15.günüden sonra ise bu enzime perifer kan lenfositlerinde rastlanmazken, doku kesitlerinde ise az sayıdaki lenfositte rastlandı. Elde edilen bulgulara dayanılarak, BG-az pozitivitesinin tavukların perifer kan lenfositlerinde embriyonal gelişme döneminin 13.gününde ortaya çıktığı ve 15.günden itibaren de ortadan kalktığı sonucuna varıldı. BG-az pozitivitesinde gözlenen bu durum, mezenkimal köken hücrelerin timus taslağına embriyonal dönemin farklı günlerinde gerçekleşen göç dalgaları halinde gelmeleri ve BG-az aktivitesinin T-lenfosit olgunlaşması aşamasında kısa bir dönem kazanılıp sonra ortadan kalkması ile açıklanabilir. Nitekim pre-timik ve pre-bursal köken hücreleri timus ve bursa Fabricii taslaklarına embriyonal süreç

içerisinde, belirli dönemlerde gerçekleşen göç dalgaları halinde gelmekte ve timusa gelenler T-lenfositlerine özgü, bursa Fabricii'ye gelenler ise B-lenfositlerine özgü enzimleri ve yüzey reseptörlerini kazanarak T- ve B-lenfosit olma yönünde farklılaşmaktadırlar (Glick 1988). Embriyonal dönemin 12-13. günlerinden önce gerçekleşen göç dalgası ile timus ve bursa Fabricii'ye gelen köken hücreler, muhtemelen birbirine benzer özelliklere sahip hücreler olup, BG-az aktivitesi yönünden de aynı özellikleri taşımaktadırlar. Bu nedenle embriyonal dönemin 12. gününde timus ve bursa Fabricii'den alınan kesitlerde gözlenen lenfosit morfolojisine sahip ve BG-az pozitif hücreler, kan yoluyla perifer lenfoid organlara göç ettiklerinden embriyonal dönemin 13. gününe ait kan frotilerinde de gözlenmektedirler. İlerleyen dönemlerde ise bu hücrelere perifer kanda rastlanmazken, organ kesitlerinde az sayıda rastlanmaktadır. Nitekim Glick (1988), köken hücrelerin 3 ayrı göç dalgası halinde embriyonal dönemin 6,5-8, 12-14 ve 18. günlerinde kan yoluyla, dalgalar halinde göç ederek timus ve bursa Fabricii taslaklarına geldiklerini ileri sürmektedir. Bu çalışmada da farklı enzim pozitivitelerinin değişik dönemlerde kazanılması, Glick'in (1988) bulgularını desteklemektedir. Perifer kandaki lenfosit morfolojisine sahip olan ve ACP-az pozitivitesi gösteren hücrelere en yüksek oranda embriyonal dönemin 13. gününde rastlanılmakta; ikinci ve üçüncü göç dalgalarının ortasına denk gelen dönem (15. gün) ile üçüncü göç dalgasının başladığı 18. günde ise bu hücrelerin sayılarında belirgin bir azalma meydana gelmektedir. Üçüncü göç dalgasının ardından, 21. günde ise ACP-az pozitif lenfosit oranı tekrar artmakta ve kuluçkadan çıkışı takip eden 4. hafta sonunda ise bu oran daha da yükselmektedir. Sonuç olarak, tavuklarda perifer kan lenfositlerinde ACP-az pozitivitesi ilk kez embriyonal dönemin 12. gününde, BG-az pozitivitesi ise embriyonal dönemin 13. gününde ilk kez ortaya çıkmakta ve ilerleyen dönemlerde perifer kandaki lenfositlerde BG-az aktivitesi ortadan kalkmaktadır.

Alfanaftil asetat esteraz (ANAE) ise tavuklarda embriyonal gelişmenin son günlerinde, yaklaşık 18. günde ortaya çıkan ve olgun T-lenfositleri için spesifik olan bir enzimdir (Basso ve ark 1980, Pruthi ve ark 1987, Maiti ve ark 1990). Koyunlarda gebeliğin 54-60. günlerinde timositlerin %2'sinin T-lenfositleri için spesifik olan T-80 monoklonal antikoruna karşı pozitif yanıt oluşturdukları bildirilirken (Miyasaka ve ark 1983), sığır fötüslerinin perifer kanlarında T-lenfositleri için spesifik olan ANAE pozitivitesine gebeliğin 60. gününde rastlanmıştır (Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1992). Bu çalışmada ise embriyonal dönemin 18. gününde, perifer kanda %2 oranında ANAE pozitif lenfosit tespit edilmiştir. Ayrıca ilk kez yine bu dönemde dalakta da ANAE pozitif

lenfositlerle ACP-az ve az sayıda BG-az pozitif lenfositler gözlenmiştir. Nitekim timus ve bursa Fabricii'de lenfosit morfolojisine sahip olan ve enzim içeren hücrelerin gözlenmesiyle birlikte, perifer kanda ve dalak dokusunda da benzer özelliklere sahip olan hücreler tespit edilmektedir.

Bu çalışmada, kuluçkadan çıkışın ilk gününde perifer kanda belirlenen ANAE pozitif ve ACP-az pozitif lenfosit oranları, kuluçkadan çıkışı takip eden 4. hafta sonunda elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Ayrıca kuluçkadan çıkışın ilk gününde bireysel farklılıkların da belirgin olduğu dikkati çekmektedir. Ancak 4 haftalık dönemde hem enzim pozitif lenfosit oranlarının arttığı ve hem de bireysel farklılıkların azaldığı dikkati çekmektedir. Çelik ve ark (1994)'nın sığırlarda yapmış oldukları bir çalışmada da doğumu takip eden ilk birkaç günde ANAE pozitif lenfosit oranlarının oldukça düşük seyrettiği, bireysel farklılıkların da oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu durumun, memelilerde doğuma bağlı stresten kaynaklanan adrenal korteks hormonlarının artışıdan ileri geldiği öne sürülmektedir (Schalm ve ark 1975). Kanatlılarda ise memelilerde olduğu gibi direkt olarak fetal-maternal ilişki olmamakla birlikte, kabuğu kırarak yeni bir ortama çıkan civcivde de benzeri bir stres mekanizması ile enzim içeren lenfosit oranlarında önemli düşüşlerin meydana gelmesi muhtemeldir. Bununla birlikte kuluçka sonrası dördüncü haftada grupların ANAE pozitif lenfosit oranları arasında önemli farkların tespit edilmemesi, aflatoksinin neden olduğu etkinin bu dönemde ortadan kalktığını göstermekle birlikte; hayvanların besleme döneminin önemli bir bölümünde immüno depresyonlu bir şekilde yaşamlarını sürdürdüklerini göstermektedir. Ancak, hücre sayılarındaki azalmanın fonksiyondaki artışla kompanze edilip edilmediği ve çalışmada AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalardan çıkan civcivlerin immün sistem fonksiyonları hakkında yeterli bilgi bulunmadığından, bu konuda daha detaylı araştırmaların yapılması gereklidir.

## **Sonuç**

Bu çalışmada AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalarda gelişen embriyoların timus, bursa Fabricii ve dalaklarının embriyonal gelişiminin kontrol grubunkilerden oldukça geri kaldığı ve en fazla etkilenen organın ise bursa Fabricii olduğu gözlenmiştir. Nitekim, kontrol gruplarında embriyonal dönemin 12-13. günlerinde bursa Fabricii'deki lenf folikülü organizasyonunun başlaması ile birlikte perifer kandaki lenfosit morfolojisine sahip hücrelerde de önemli oranda ACP-az pozitivitesi tespit edilmiş; deney gruplarında

ise özellikle 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında folikül organizasyonunun gecikmesine paralel olarak perifer kandaki lenfositlerin ACP-az pozitiflerinde de önemli oranlarda düşüşlerin olduğu dikkati çekmiştir.

AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalardan çıkan civcivlerde kuluçkadan çıkışın ilk günü ve takip eden 4.hafta sonunda timusun histolojisinde, ışık mikroskopik seviyede tespit edilebilen yapısal bir bozukluk gözlenmemiştir. Ancak kuluçkadan çıkışın ilk gününde, dalaktaki lenf foliküllerinin kontrollerdekilerden daha küçük oldukları ve germinal merkezlerinin de henüz şekillenmemiş olduğu; bursa Fabricii'de ise organa özgü lenf foliküllerinin az sayıda ve atrofik olmalarının yanında FAE'nin de kısmen basıklaşmış hücrelerden oluştuğu tespit edilmiştir. Dalak ve bursa Fabricii'deki bu değişiklikler bu organların fonksiyonlarında önemli yetmezliklere neden olabilir. Nitekim bursa Fabricii'deki FAE, organdaki lenf foliküllerinin medullaları ile fonksiyonel bir bütünlük oluşturmakta ve organ lümeninden aldığı yabancı partikülleri birkaç saat içerisinde lenf folikülü medullasına aktarmaktadır. Antijenik uyarımların selektif olarak ve kontrollü bir biçimde alınmasını sağlayan bu işlevin aksamasının, immün sistem fonksiyonunda da yetmezliğe neden olabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada, kuluçkadan çıkışın ilk günü perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranları dikkate alındığında gruplar arasındaki farklar önemsiz ( $p>0,05$ ) iken (Tablo 4.2), 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarındaki civcivlerin perifer kanlarındaki lenfosit oranları ile ANAE pozitif lenfosit oranları kontrol gruplarından önemli ( $p<0,05$ ) oranda düşük bulunmuştur (Tablo 4.3). Özellikle perifer kandaki lenfosit oranlarında tespit edilen düşüşün, ANAE pozitif lenfosit (T-lenfosit) oranlarındaki düşüşlerle birlikte gerçekleşmiş olması, yumurtaya verilen AFB<sub>1</sub>'in düşük dozlarda bile hücrel immünite üzerinde belirgin süpresyona neden olduğunu göstermektedir. Kuluçkadan çıkışın 4.haftasında ise kontrol ve deney gruplarının lenfosit oranlarının yanı sıra hem ANAE pozitif lenfosit oranları ve hem de ACP-az pozitif lenfosit oranları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Bu da hayvanın immün sistemindeki defekti bu dönem boyunca tamir edebildiğini göstermekle birlikte, hücre sayılarının kontrol grubu hayvanlara yakın olması, sistemin tamamen fonksiyonlarında iyileşme anlamına gelmeyeceği gibi, özellikle broyler tavukçuluğunda bu süre zaten besleme döneminin son günlerine karşılık geldiğinden, bu iyileşmenin pratikte oldukça kısıtlı bir yararının olacağı açıktır. Bu nedenle yumurtaya verilen AFB<sub>1</sub>'in, perifer kan lenfosit ve özellikle de T-lenfosit oranlarında düşüşlere neden olduğu hayvanlarda, bu



hücrelerin fonksiyonlarındaki kayıpların da belirlenmesinin gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

Bu çalışmada AFB<sub>1</sub> verilen deney gruplarının mortaliteleri arasında önemli ( $p<0,05$ ) farklılıklar gözlenmiştir. Düşük dozda (5 ng ve 10 ng) AFB<sub>1</sub> verilen gruplardaki embriyoların tamamının ölmemiş olması ise toksine karşı bireysel duyarlılığın farklı olmasıyla hatta bireysel dirençle açıklanabilir. Bu çalışmada incelenen parametrelerin, farklı ırklar üzerinde yapılacak olan çalışmalarda da ele alınması, AFB<sub>1</sub>'e dirençli hat ve ırkların geliştirilmesinde yararlı olabilir.



## 6.ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı  
DOKTORA TEZİ/KONYA-2001

Emrah SUR

**Danışman**

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

### **Yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub>'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması**

Bu çalışmada, yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'in embriyotoksik etkileri ile kanatlı lenfoid organları üzerindeki etkilerinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada yumurtacı ırkı tavuklara ait toplam 651 adet yumurta 7 ayrı gruba ayrıldı. Bu gruplardan ilk ikisi kontrol gruplarını (Kontrol-1 ve kontrol-2) oluştururken, çözücü olarak kullanılan %30'luk etil alkol (%30 ETOH) grubu dışında 4 farklı AFB<sub>1</sub> doz grubu oluşturuldu (5 ng, 10 ng, 20 ng ve 40 ng AFB<sub>1</sub> grupları). Test solüsyonları inkübasyon öncesinde hava kamarası yoluyla yumurtalara enjekte edildiler. Inkübasyonun 7, 10, 12, 13, 15 ve 18. günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların gelişme evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre belirlendi. Ölü embriyolar evrelerine göre sınıflandırılarak; embriyonik ölümlerin dağılımları belirlendi ve elde edilen sayısal veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi. Grupların mortaliteleri arasındaki farkların önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edildi.

Her döneme ait embriyolardan ve civcivlerden kuluçkadan çıkış dönemi ile takip eden 4.haftada kan örnekleri ile timus, bursa Fabricii ve dalak dokusu örnekleri alınarak

gerek histolojik yapının belirlenmesi gerekse de enzim histokimyasal yöntemler için uygun yöntemlerle işlenerek hazırlanan preparatlar ışık mikroskobuyla incelendi.

AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksitesinin, dozdaki artışa paralel olarak arttığı; erken embriyonik ölümlerin çoğunlukla yüksek doz gruplarında ve erken embriyonal gelişme evrelerinde yoğunlaştığı tespit edildi. Ayrıca yine yüksek doz gruplarındaki çoğu yumurtada embriyonal disk sahasında aşırı ve düzensiz üreyen area opaca hücrelerinin periferden area pellucida'yı sıkıştırarak fitikleştirmesiyle belirgin olan anormal gelişme tespit edildi.

Histolojik kesitlerde özellikle 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından elde edilen embriyoların timus, bursa Fabricii ve dalaklarında gelişmenin baskılandığı ve bu organların, kontrollerdeki organlardan daha küçük oldukları dikkati çekti.

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde timus normal gelişimini tamamlamış olduğu halde, 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından elde edilen civcivlerde bursa Fabricii ve dalağın gelişiminin tamamlanmamış olduğu gözlemlendi. Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta sonunda ise bu iki organın da normal histolojik yapıyı kazanmış oldukları saptandı.

Enzim histokimyasal çalışmalar sonucunda perifer kan lenfositlerinde 12.günde ilk olarak ortaya çıkan enzim asit fosfataz (ACP-az) olduğu; bunu 13.günde beta-glukuronidaz (BG-az) ve son olarak da 18.günde ortaya çıkan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE)'in izlediği tespit edildi. Kuluçkanın 13.gününde perifer kan lenfositlerinde ortaya çıkan BG-az, ilerleyen dönemlerde gözlenmedi.

Embriyonal dönemde ACP-az pozitif lenfosit oranlarının 10, 20 ve 40 ng AFB<sub>1</sub> gruplarında belirgin şekilde kontrol gruplarındakilerden daha düşük olduğu dikkati çekti.

Kuluçkadan çıkışın ilk günü grupların ACP-az pozitif lenfosit oranları arasındaki farkların önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu, buna karşın lenfosit oranları ile ANAE pozitif lenfositlerin oranlarının 5 ve 10 ng AFB<sub>1</sub> gruplarından çıkan civcivlerde önemli oranda ( $p<0,05$ ) daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak kuluçkadan çıkışı takip eden 4.hafta sonunda lenfosit oranları ile gerek ACP-az pozitif lenfosit oranları ve gerekse de ANAE

pozitif lenfosit oranları açısından kontrol ve deney grupları arasındaki farkın önemsiz ( $p>0,05$ ) olduğu görüldü.



## 7.SUMMARY

### **Enzyme histochemical investigations on the effects of aflatoxin B<sub>1</sub>, administrated in ovo, on the embryonic development of chicken lymphoid organs.**

In this study, embryotoxicity and detrimental effects of aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) on the embryonic development of chicken lymphoid organs were determined by enzyme histochemical and histological methods.

For this purpose, 651 laying hen's eggs were used. The eggs were divided into 7 groups. Two of them were used as a controls (control-1 and control-2). Except for the solvent (%30 ethanol, ETOH) group, 4 different AFB<sub>1</sub> dose groups were designed (5 ng, 10 ng, 20 ng and 40 ng AFB<sub>1</sub>). Test solutions were injected via the air-sac at pre-incubation period. Eggs from each group were opened at 7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>,13<sup>th</sup>,15<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days of the incubation. Embryonic stages were determined according to the Hamburger-Hamilton scale. Dead embryos of each group were determined and embryonic morthality values were calculated. Data was analysed by using statistical methods. The differences between morthality values of the controls and the experimental groups were found to be statistically significant.

The blood and tissue samples from the thymus, bursa of Fabricius and the spleen were taken from the embryos of each group at different incubation periods, at the end of the incubation and by the fourth week after hatching. Tissue samples were processed for enzyme histochemical methods in addition to routine histological techniques. The effects of AFB<sub>1</sub> on both enzymatic profile of peripheral blood lymphocytes and embryonic development of lymphoid organs were investigated by light microscope. It was concluded that the embryotoxic effects of AFB<sub>1</sub> to be dose-dependent and early embryonic deaths were particularly increased at high- AFB<sub>1</sub> doses. On the other hand, especially in 20 and 40 ng AFB<sub>1</sub> groups, embryonic disc abnormality which characterized with area opaca cells those irregularly proliferated around the area pellicida was observed. Area pellicida protruded out of the embryonal disc because of the copression caused by area opaca cells.

In histological sections, particularly taken from 10, 20 and 40 ng AFB<sub>1</sub> groups, the embryonic development of thymus, bursa of Fabricius and spleen were dramatically impaired and the anlagen of those organs underdeveloped when compared to those of controls.

On the hatching day, development of the thymus was complete while in 5 and 10 ng AFB<sub>1</sub> groups, the development of spleen and bursa of Fabricius were incomplete. At the end of the fourth week after hatching, bursa of Fabricius and spleen were completely developed.

Enzyme histochemical demonstrations were carried out in all tissue samples. The first observed enzyme in the blood cells with lymphocyte morphology was acid phosphatase (ACP-ase) which appeared on the 12<sup>th</sup> day of incubation period, the second was beta-glucuronidase (BG-ase) which appeared on the 13<sup>th</sup> day of incubation period and the last observed was alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) which appeared on the 18<sup>th</sup> day of incubation period. However, BG-ase disappeared in those cells at the later stages of the incubation.

During embryonal period, significant declines were observed in ACP-ase positive lymphocytes rates in 10, 20 and 40 ng AFB<sub>1</sub> groups.

On the hatching day, ACP-ase positive lymphocyte proportions were not different while ANAE positive lymphocyte counts were significantly decreased in 5 and 10 ng AFB<sub>1</sub> groups. By the fourth week after hatching, there was no difference in peripheral blood ACP-ase positive, ANAE positive lymphocyte proportions and lymphocyte proportions. Besides there was no difference in histology of lymphoid organs between controls and experimentals.

## 8. KAYNAKLAR

- Ağaçdelen HH ve Acet HA (1993)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> ve aflatoxin M<sub>1</sub>'in yumurtaya geçiş düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine deneysel araştırmalar*, Veterinarium, 4(2), 36-43.
- Albertini S, Friedrich U, Holderegger C and Würgler FE (1988)** *The in vitro porcine brain tubulin assembly assay: effects of a genotoxic carcinogen (aflatoxin B<sub>1</sub>), eight tumor promoters and nine miscellaneous substances*, Mutation Res, 201, 283-292.
- Aldemir C (1993)** *Aflatoxinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine araştırma*, Veterinarium, 4(1), 16-21.
- Azzam AH and Gabal MA (1997)** *Interaction of aflatoxin in feed and immunization against selected infectious diseases.I. Infectious bursal disease*, Avian Pathol, 26, 317-325.
- Backman DE (1997)** *Development of thymus*, Micros Res Tech, 38, 209-215.
- Balachandran C and Ramakrishnan R (1987)** *An experimental study on the pathology of aflatoxicosis in broiler chicken*, Indian Vet J, 64, 911-914.
- Barka T and Anderson PJ (1962)** *Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosaniline as a coupler*, J Histochem Cytochem, 10, 741-752.
- Bassir O and Adenkunle A (1970)** *Teratogenic action of aflatoxin B<sub>1</sub>, palmotoxin B<sub>0</sub> and palmotoxin G<sub>0</sub> on the chick embryo*, J Pathol, 102, 49-51.
- Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A and ZanESCO L (1980)** *Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes*, Br J Haematol, 44, 577-582.
- Batra P, Pruthi AK and Sadana JR (1991)** *Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the efficiency of turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease*, Res Vet Sci, 51, 115-119.
- Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD and Loechler EL (1988)** *Mapping the binding site of aflatoxin B<sub>1</sub> in DNA: Systematic analysis of reactivity of aflatoxin B<sub>1</sub> with guanines in different DNA sequences*, Biochem, 27, 472-481.
- Bilgiç HN ve Yeşildere T (1992)** *Civcivlerde deneysel aflatoksikoziste böbrek lezyonları*, İÜ Vet Fak Derg, 18(2), 102-108.
- Bilgiç HN ve Türkmen H (1993)** *Gökkuşluğu alabalıklarında (Salmogairdneri) aflatoksikozis olaylarında karaciğerde patolojik bulgular*, Türk Vet Hekim Derg, 5(5), 30-33.

- Boorman GA, Hong HL, Dieter MP, Hayes HT, Pohland AE, Stack M and Luster MI (1984)** *Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 72, 304-312.
- Bradbury P and Gordon KC (1990)** *Connective tissues and stains*, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. by JD Bancroft and A Stewens, 119-142, 3<sup>rd</sup> edition, The Bath Press, Avon.
- Busbee DL, Norman JO and Ziprin RL (1990)** *Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B<sub>1</sub> and benzo(a)pyrene*, *Arch Toxicol*, 64, 285-290.
- Campbell ML, May JD, Huff WE and Doerr A (1983)** *Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis*, *Poult Sci*, 62, 2138-2144.
- Carlson BM (1981)** Ductless glands, pharyngeal derivatives and the lymphoid organs, In "Patten's Foundations of Embryology" Ed. by BM Carlson, 425-439, Fourth Edition, Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- Catowsky D (1981)** *Leucocyte cytochemical and immunological techniques*, In "Practical Haematology" Ed. by JV Dacie and SM Lewis, 143-174, Seventh edition, Churchill Livingstone.
- Cavalheiro ACL (1981)** *Aflatoxin and aflatoxicosis*, *World's Poult Sci J*, 37(1), 34-38.
- Cavin C, Holzhäuser D, Constable A, Huggett AC and Schilter B (1998)** *The coffee specific diterpens cafestol and kahweol protect against aflatoxin B<sub>1</sub> – induced genotoxicity through a dual mechanism*, *Carcinogenesis*, 19(8), 1396-1375.
- Chattopadhyay SK, Taskar PK, Schwabe O, Das YT and Brown HD (1985)** *Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks*, *Cancer Biochem Biophys*, 8, 67-75.
- Cilieviici O, Ghidus ICE and Moldovan A (1980)** *The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the chick embryo development*, *Morphol-Embryol*, 25(4), 309-314.
- Cook HC (1990)** *Carbonhydrates*, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. by JD Bancroft and A Stewens, 143-153, 3<sup>rd</sup> Edition, The Bath Press, Avon.
- Corrier DE and Norman JO (1988)** *Effects of T-2 mycotoxin on tumor susceptibility in mice*, *Am J Vet Res*, 49(12), 2147-2150.
- Corrier D (1991)** *Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression*, *Vet Immunol Immunopatho*, 30, 73-87.



- Cukrova V, Langrova E and Akao M (1991)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on myelopoiesis in vitro*, Toxicology, 70, 203-211.
- Culling CFA, Allison RT and Barr WT (1985)** *Cellular Pathology Technique*, Butterworths and Co Ltd, London.
- Cusumano V, Rossanof F, Merendino RA, Arena A, Costa GB, Mancuso G et al (1996)** *Immunobiological activities of mould products: functional impairment of human monocytes exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>*, Res Microbiol, 147, 385-391.
- Çelik İ, Aştı RN ve Ergene N (1991)** *İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi*, SÜ Tıp Fak Derg, 7(4), 497-503.
- Çelik İ, Aştı RN ve Boyraz MÜ (1992)** *Sığır fetal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar*, SÜ Vet Fak Derg, 8(2), 41-44.
- Çelik İ, Aştı RN, Kadak R ve Işık MK (1994)** *Farklı yaşlardaki sığırların perifer kan T-lenfosit oranlarında görülen değişiklikler*, Hayvancılık Araş Derg, 4(2), 68-72.
- Çelik İ, Demet Ö, Dönmez HH, Oğuz H ve Boydak M (1996)** *Aflatoksin ve aflatoksin bağlayıcısı olan polivinilpolipirolidon (PVPP) verilen broylerlerde peritoneal makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinin belirlenmesi*, Vet Bil Derg, 12(1), 145-151.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E and Nizamlioğlu F (2000a)** *Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus NR1.1. 1999*, Br Poult Sci, 41(4), 401-409.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Dönmez HH, Boydak M and Sur E (2000b)** *Efficiency of polyvinylpolypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers*, Br Poult Sci, 41(4), 430-439.
- Çetin İ (1990)** *Avian aflatoxicosis*, Etlik Vet Mik Derg, 7(1),160-181.
- Dafalla R, Hassan YM and Adam SEI (1987a)** *Fatty and hemorrhagic liver and kidney syndrome in breeding hens caused by B<sub>1</sub> and heat stress in Sudan*, Vet Hum Toxicol, 29(3), 252-254.
- Dafalla R, Yagi AI and Adam SEI (1987b)** *Experimental aflatoxicosis in Hybro-Type chicks: Sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes*, Vet Hum Toxicol, 29(3), 222-226.

- Dalvi RR and McGowan C (1984)** *Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chicken by purified aflatoxin B<sub>1</sub> and its reversal by activated charcoal, phenobarbital and reduced glutathione*, Poultry Sci, 63, 485-491.
- Dashek WV, Barker SM, Statkiewicz WR, Shanks ET and Lewellyn GC (1983)** *Histochemical analysis of liver cells from short term aflatoxin-dosed and non-dosed Coturnix coturnix japonica. 1. Aflatoxin-sensitive quail*, Poultry Sci, 62, 2347-2359.
- Dietert RR, Qureshi MA, Nanna UC and Bloom SE (1985)** *Embryonic exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> : Mutagenicity and influence on development and immunity*, Environ Mutagenesis, 7, 715-725.
- Donnelly PJ, Steward RK, Ali SL, Conlan AA, Reid KR, Petsikas D and Massey TE (1996)** *Biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub> in human lung*, Carcinogenesis, 17(11), 2487-2494.
- Dönmez HH ve Çelik İ (1998)** *Erken embriyonal dönemde yumurtaya verilen testosteron propiyonat'ın tavuk bursa Fabricii'si üzerindeki etkileri*, Vet Bil Derg, 14(1), 119-132.
- Dugyala RR, Kim YW and Sharma RP (1994)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and T-2 toxin on the granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow cultures*, Immunopharmacology, 27, 57-65.
- Dugyala RR and Sharma RP (1996)** *The effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes*, Int J Immunopharmacol, 18(10), 599-608.
- Elis J and Dipaolo JA (1967)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> and malformations*, Arch Pathol, 83, 53-57.
- Ellis WO, Smith JP, Simpson BK and Oldham JH (1991)** *Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control*, Critical Rev Food Sci Nutr, 30(3), 403-439.
- Eser SR, Kumova B and Sivas S (1978)** *Bulgurlara aflatoksin bulaşması ve karaciğer kanseri ile ilişkisi*, Cerrahpaşa Tıp Fak Derg, 9, 222-228.
- Espada Y, Domingo M, Gomez J and Calvo MA (1992)** *Pathological lesions following an experimental intoxication with B<sub>1</sub> in broiler chickens*, Res Vet Sci, 53, 275-279.
- Etches R (1996)** *Embryonic Development*, In: *Reproduction in Poultry*, CAB International, Cambridge.
- Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos J, Gomez J, Luco DF and Chavez G (1994)** *Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed*, Avian Pathol, 23, 37-47.

- Gabal MA and Azzam AH (1998)** *Interaction of aflatoxin in the food and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one-day-old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursal diseases*, Avian Pathol, 27, 290-295.
- Galtier P (1998)** Biological fate of mycotoxins in animals, Revue Méd Vét, 149, 549-554.
- Geissler F and Faustman EM (1988)** *Developmental toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the rodent embryo in vitro: Contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity*, Teratology, 37, 101-111.
- Gerberick GF and Sorenson WG (1983)** *Toxicity of T-2 toxin, a Fusarium mycotoxin, to alveolar macrophages in vitro*, Environ Res, 32, 269-285.
- Ghosh RC, Chauhan HVS and Roy S (1990)** *Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis*, Br Vet J, 146, 457-462.
- Ghosh RC, Chauhan HVS and Jha GJ (1991)** *Suppression cell-mediated immunity by purified B<sub>1</sub> in broiler chicks*, Vet Immunol Immunopathol, 28, 165-172.
- Giambrone JJ, Ewert DL, Wyatt RD and Eidson CS (1978)** Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken, Am J Vet Res, 39(2), 305-308.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985a)** *Effects of purified aflatoxin on broiler chickens*, Poult Sci, 64, 852-858.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985b)** *Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens*, Poult Sci, 64, 1678-1684.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985c)** *Effect of purified aflatoxin on turkeys*, Poult Sci, 64, 859-865.
- Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF and Huff WE (1990)** *Research note: Altered renal function in broilers during aflatoxicosis*, Poult Sci, 69, 1796-1799.
- Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF, Huff WE and Thomas W (1991)** *Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin D metabolism*, J Toxicol Environ Health, 34, 309-321.
- Glavitis R and Salyi G (1998)** *Mycotoxicosis in poultry*, Poult Int, 37(12), 26-40.
- Glick B (1988)** *Bursa of Fabricius: Development, growth, modulation, and endocrine function*, CRC Crit Rev Poult Biol, 1(2), 107-132.
- Goldberg AF and Barka T (1962)** *Acid phosphatase activity in human blood cells*, Nature, 21, 292.

- Graczyk S (1984)** *The effect of a single dose of sheep's erythrocytes on the activity of acid phosphatase in lymphocytes of peripheral blood in bursectomized chickens*, Folia Histochem Cytobiol, 22(2), 85-89.
- Graczyk S (1987)** *Cytochemical examination of peripheral blood lymphocytes in bursectomized chickens*, Folia Histochem Cytobiol, 25(1), 45-59.
- Graczyk S (1994)** *The effect of anti-bursa serum (ABS) on the intensity of acid phosphatase reaction in bursa-dependent structures of the spleen and on the level of antibodies in the blood serum*, Arch Vet Pol, 34(1-2), 25-36.
- Gradelet S, LeBon AM, Bergès R, Suschetet M and Astorg P (1998)** *Dietary carotenoids inhibit B<sub>1</sub>-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism*, Carcinogenesis, 19(3), 403-411.
- Gupta RKP, Bhatia KC, Ram GC and Singh J (1985)** *A report of aflatoxicosis in poultry*, Indian Vet J, 62, 203-208.
- Güray Ö ve Vural N (1968)** *Mikotoksinlerle meydana gelen besin zehirlenmeleri minasebeti ile aflatoksinler üzerine bir araştırma*, AÜTF Mec XXI, IV, 1030-1044.
- Hafez AH, Megalla SE, Abdel-Fattah HM and Kamel YY (1982)** *Aflatoxin and aflatoxicosis. II. Effects of aflatoxin on ovaries testicles in mature domestic fowl*, Mycopathol, 77(3), 137-139.
- Hamburger V and Hamilton HL (1951)** *A series of normal stages in the development of chick embryo*, J Morphol, 88, 49-92.
- Hamilton PB (1982)** *Mycotoxins and farm animals*, Refush Vet, 39(1-2), 17-45.
- Harris AJ, Shaddock JG, Manjanatha MG, Lisenbey JA and Casciano DA (1998)** *Identification of differentially expressed genes in aflatoxin B<sub>1</sub>-treated cultured primary rat hepatocytes and Fischer 344 rats*, Carcinogenesis, 19(8), 1451-1458.
- Harvey RB, Phillips TD, Ellis JA, Kubena LF Huff WE and Peterson HD (1991)** *Effects on aflatoxin M<sub>1</sub> residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows*, Am J Vet Res, 52(9), 1556-1559.
- Hassa O (1955)** *Evcil kanatlılarda tavukların (yerli) bursa Fabricii'si üzerinde ontogenetik araştırmalar ve organın hemopoietik karakteri*, AÜ Vet Fak Yayın, 70, Çalışmalar: 39, Yeni Desen Matbaası, Ankara.
- Hatch RC (1988)** *Poison causing abdominal distress of liver or kidney damage*, In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Eds. by NH Both and Le McDonald, Sixth edition, The Iowa State University Press, 1102-1125.

- Hegazy SM, Azzam A and Gabal MA (1991)** *Interaction of naturally occurring aflatoxins in poultry fed and immunization against fowl cholera*, Poul Sci, 70, 2425-2428.
- Higgy KE, Burns GF and Hayhoe FGJ (1977)** *Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry*, Scand J Haematol, 18, 437-448.
- Hodges RD (1974)** *The histology of the fowl*, Academic Press Inc Ltd, London.
- Holt PS and De Loach JR (1988)** *In vitro effect of T-2 mycotoxin on the immune response of mice*, Am J Vet Res, 49(9), 1480-1484.
- Hoshimoto Y and Sugimura M (1976)** *Histological and quantitative studies on the postnatal growth of the thymus and bursa of Fabricius of White Pekin Ducks*, Jap J Vet Res, 24, 65-76.
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Corrier DE and Mollenhauer HH (1986)** *Progression of aflatoxicosis in broiler chickens*, Poul Sci, 65, 1891-1899.
- Iwaki M, Kitagawa T, Akamatsu Y and Aibara K (1990)** *Cytotoxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and its association with cellular components in chicken embryo primary cultured cells*, Biochem Biophys Acta, 1035, 146-153.
- İstanbuluoğlu E ve Arda M (1979)** *Kanatlılarda mikotoksikozis*, Üçüncü Ulusal Tavukçuluk Kongresi, 3-7.
- Jacobson WC and Wiseman HG (1974)** *The transmission of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs*, Poul Sci, 53, 1743-1745.
- Jain NC (1993)** *The lymphocytes and plasma cells*, In: Essentials of Veterinary Hematology, Ed. by NC Jain, 278-294, Lea&Febiger, Philadelphia.
- Jakab GJ, Hmieleski RR, Zarba A, Hemenway DR and Groopman JD (1994)** *Respiratory aflatoxicosis: Suppression of pulmonary and systemic host defences in rats and mice*, Toxicol Appl Pharmacol, 125, 198-205.
- Jeffery FH, Morton JG and Miller JK (1984)** *Effects of some clinically significant mycotoxins on the incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells*, Res Vet Sci, 37, 30-38.
- Jelinek R (1977)** *The chick embryotoxicity screening test (CHEST)*, In "Methods in Prenatal Toxicology", Eds. by D Neubert, HJ Merker and TE Kwasigrooh, 381-386, Georg Thieme, Stuttgart.
- Jelinek R, Peterka M and Rychter Z (1985)** *Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested*, Indian J Exp Biol, 23, 588-595.
- Jindal N, Mahipal SK and Mahajan NK (1994)** *Toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chicks and its reduction by activated charcoal*, Res Vet Sci, 56, 37-40.

- Johnson EM (1986)** *False positives/false negatives in developmental toxicology and teratology*, *Teratology*, 34, 361-362.
- Jonauskiene I, Petniunas P and Keblys M (1998)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> and its effect on immunobiochemical changes in the organism of mice and chickens*, *Revue Méd Vét, Satellite Meeting IUTOX, VIII. International Congress of Toxicology*, 635.
- Kajikawa O, Koyama H, Yashikawa T, Tsubaki S and Saito H (1983)** *Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*, *Am J Vet Res*, 44(8), 1549-1552.
- Kaplanski C, Chisari FV and Wild CP (1997)** *Minisatellite rearrangements are increased in liver tumors induced by transplacental aflatoxin B<sub>1</sub> treatment of hepatitis B virus transgenic mice, but not in spontaneously arising tumours*, *Carcinogenesis*, 18(4), 633-639.
- Kaplow LS and Burstone MS (1964)** *Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haemopoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques*, *J Histochem Cytochem*, 12(2), 805-811.
- Kärenlampi SO (1987)** *Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>*, *Biochem Biophys Res Commun*, 145(2), 15, 854-860.
- Kaya S (1982)** *Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması*, *AÜ Vet Fak Derg*, 29(3-4), 443-457.
- Kaya S (1998)** *Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri*, *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, Eds. S.Kaya, İ.Pirinçci ve A.Bilgili, Medisan Yayınevi, 35, 348-354, Ankara.
- Keçeci T, Demet Ö ve Oğuz H (1995)** *Broyles civcivlerde yeme yalnız ve kombine katıan aflatoksin ve adsorban (Mycofix Plus)'ın bazı hematolojik ve serum biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi*, *Vet Bil Derg*, 11(2), 59-64.
- Keçeci T, Oğuz H, Kurtoğlu V and Demet Ö (1998)** *Effects of polyvinylpolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis*, *Br Poult Sci*, 39, 452-458.
- Kelly DE, Wood RL and Enders AC (1984)** *Lymphatic organs*, In "Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy", 18<sup>th</sup> edition, Ed. by DE Kelly, RL Wood and AC Anders, Williams and Wilkins Baltimore, London.
- Kemper FH and Luepke NP (1986)** *Toxicity testing by the hen's egg test (HET)*, *Fd Chem Toxic*, 24(6-7), 647-648.

- Khan MZI, Hashimoto Y and Asaduzzman M (1998)** *Development of T-cell subpopulations in postnatal chicken lymphoid organs*, Veterinarski Arhc, 68(5), 183-189.
- Kıran MM, Demet Ö, Ortatatlı M and Oğuz H (1998)** *The preventive effect of polyvinylpolypyrrolidone on aflatoxicosis in broilers*, Avian Pathol, 27, 250-255.
- Kichou F and Walser MM (1994)** *Effects on aflatoxin B<sub>1</sub> on chicken chondrocytes in culture*, Avian Dis, 38, 11-15.
- Knowles DM, Hoffman HT, Ferrarini M and Kunkel HG (1978)** *The demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker*, Cell Immunol, 35, 112-123.
- Knowles DM and Holck S (1978)** *Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase*, Lab Invest, 39(1), 70-76.
- Knowles DM and Halper JP (1980)** *Human medullary and kortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAF) activity*, J Immunol, 125(6), 2823-2825.
- Kocaöz N, Çelik İ ve Ünsal S (1997a)** *Tavuk bursa Fabricii'sinin embriyonal gelişmesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar*, Vet Bil Derg, 13(1), 43-51.
- Kocaöz N, Çelik İ ve Ünsal S (1997b)** *Kuluçkadan çıkıştan sonra tavuk bursa Fabricii'sinde oluşan histolojik değişiklikler*, Vet Bil Derg, 13(1), 77-84.
- Konuk T (1981)** *Pratik Fizyoloji*, AÜ Vet Fak Yayın, 378, AÜ Basımevi, Ankara.
- Krishna L, Dawra RK, Vaid J and Gupta VK (1991)** *An outbreak of aflatoxicosis in Angora rabbits*, Vet Hum Toxicol, 33(2), 159-161.
- Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE and Huff WE (1990)** *Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate*, Poult Sci, 69, 727-735.
- Kucera P and Burnand MB (1987)** *Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro*, Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 7, 427-447.
- Latshaw WK (1987)** *Mesenteries and compartmentalization*, In "Veterinary Developmental Anatomy" , Ed. by BC Decker, Inc PO Box 30246, 169-180, Philadelphia, Pennsylvania.
- Leeson S, Diaz G and Summers JD (1995)** *Aflatoxins*, In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds. by S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, Published by: University Books, 249-298, PO Box 1326, Guelph, Ontario, Canada.

- Li CY, Yam LT and Crosby WH (1972)** *Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen*, J Histochem Cytochem, 20(12), 1049-1058.
- Lindemann MD, Blodgett DJ, Kornegay ET and Schuring GG (1993)** *Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine*, J Anim Sci, 71, 171-178.
- Lorbacher P, Yam LT and Mitus WJ (1967)** *Cytochemical demonstration of  $\beta$ -glucuronidase activity in blood and bone marrow cells*, J Histochem Cytochem, 15(11), 680-687.
- Lupetti M, Dolfi A, Giannessi F, Bianchi F and Mickelucci S (1990)** *Reappraisal of histogenesis in the bursal lymphoid follicle of the chicken*, Am J Anat, 187, 287-302.
- Luster MI, Germolec DR, Burleson GR, Jameson CW, Ackermann MF, Lamm KR and Hayes HT (1987)** *Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A*, Cancer Res, 47(1), 2259-2263.
- Lyman BA, Erki L, Biedrzycka DW, Devlin TM and Ch'ih JJ (1988)** *Modification of protein synthetic components by aflatoxin B<sub>1</sub>*, Biochem Pharmacol, 37(8), 1481-1486.
- Machin GA, Halper JP and Knowles DM (1980)** *Cytochemically demonstrable  $\beta$ -glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells*, Blood, 56(6), 111-119.
- Maiti NK, Saini SS and Sharma SN (1990)** *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*, Vet Res Commun, 14, 207-210.
- Maskar Ü (1976)** *Embriyoloji Ders Kitabı*, 5. Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul.
- Mayura K, Abdel-Wahhab MA, McKenzie KS, Sarr AB, Edwards JF, Naguib K and Phillips TD (1998)** *Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: Potential for hidden risks*, Toxicol Sci, 175-182.
- Mc Loughin ME, Pier AC and Thurston JR (1984)** *Use of bacteria and yeast to identify T lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues of healthy guinea pigs and guinea pigs fed aflatoxin*, Am J Vet Res, 45(9), 1795-1799.
- Meneghini R and Schumacher RI (1977)** *Aflatoxin B<sub>1</sub>, a selective inhibitor of DNA synthesis in mammalian cells*, Chem Biol Interact, 18(3), 267-276.
- Mert N, Yakışık M, Antaplı M ve Tanrıverdi M (1987)** *Civcivlerde kronik aflatoksikozis üzerinde biyokimyasal araştırmalar*, UÜ Vet Fak Derg, 1, 2, 3, (6-7), 120-124.
- Michael J and Ratcliffe H (1985)** *The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius*, Immunol Today, 6(7), 223-226.



- Miller DM, Clark JD, Hatch RC and Jain AV (1984)** *Caprine aflatoxicosis: Serum electrophoresis and pathologic change*, Am J Vet Res, 45(6), 1136-1141.
- Miyasaka M, Heron I, Duddler L, Cahill RNP, Fermi L, Knaak T and Trnka Z (1983)** *Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep: I. Recognition of sheep T-lymphocyte differentiation antigen by a monoclonal antibody T-80*, Immunol, 49, 545-552.
- Mohapatra NK and Roberts JF (1985)** *In vitro effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on rat liver macrophages (Kuffer's cells)*, Toxicol Letters, 29, 177-181.
- Mohiuddin SM, Reddy MV, Reddy MM and Ramakrishna K (1986)** *Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry*, Indian Vet J, 63, 442-445.
- Moriya O and Ichikawa Y (1989)** *Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos*, Acta Histochem, 87(2), 99-105.
- Mueller J, Brundel Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW and Cottier H (1975)** *Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes*, Eur J Immunol, 5, 270-274.
- Neldon-Ortiz DL and Qureshi MA (1992a)** *The effect of direct and microsomal activated aflatoxin B<sub>1</sub> on chicken peritoneal macrophages in vitro*, Vet Immunol Immunopathol, 31, 61-76.
- Neldon-Ortiz DL and Qureshi MA (1992b)** *Effects of AFB<sub>1</sub> embryonic exposure on chicken mononuclear phagocytic cell functions*, Dev Comp Immunol, 16(2-3), 187-196.
- Obioha WI, Stahr HM and Kraft AA (1986)** *Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabeled 14C aflatoxin B<sub>1</sub>*, J Food Protec, 49(10), 799-805.
- Oğuz H (1997)** *Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.
- Oğuz H and Kurtoğlu V (2000)** *Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis*, Br Poult Sci, 41, 512-517.
- Oğuz H, Keçeci T, Birdane YO, Önder F and Kurtoğlu V (2000a)** *Effect of clinoptilolite on serum haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis*, Res Vet Sci, 69, 89-93.
- Oğuz H, Kurtoğlu V and Coşkun B (2000b)** *Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb exposure)*, Res Vet Sci, 69, 197-201.

- Raina JS and Singh B (1991)** *Prevalance and pathology of mycotoxicosis in poultry in Punjab*, Indian J Anim Sci, 61(7), 671-676.
- Raisuddin S, Singh KP, Zaidi SIA, Paul BN and Ray PK (1993)** *Immunosuppressive effects of aflatoxin growing rats*, Mycopathologia, 124, 189-194.
- Rajan A, Maryamma KI and Nair MG (1989)** *Aflatoxin induced hepatopathy in pigs and dugs*, J Toxicol – Toxin Rev, 8(1-2), 255-263.
- Ram KV, Rao DG and Rao PR (1988)** *Sequential gross and histological changes of bursa and thymus in acute and chronic experimental aflatoxicosis of broiler birds*, Indian J Anim Sci, 58(9), 1011-1018.
- Ramos JA, Ramis AJ, Marco A, Domingo M, Rabanal R and Ferrer L (1992)** *Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine*, Am J Vet Res, 53(8), 1418-1426.
- Ranki A (1978)** *Non-spesific esterase activity in human lymphocytes*, Clin Immunol Immunopathol, 10, 47-58.
- Rao KS and Gehring PJ (1971)** *Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in monkeys*, Toxicol Appl Pharmacol, 19, 169-175.
- Reddy RV, Taylor MJ and Sharma RP (1987)** *Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>*, Toxicology, 43, 123-132.
- Reddy RV and Sharma RP (1989)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on murine lymphocytic functions*, Toxicology, 54, 31-44.
- Reddy CV (1992)** *Aflatoxins in feed: an enemy to poultry procedures in the topics*, Miss World Poult, 8(6), 19-20.
- Rogers AE and Newberne PM (1971)** *Diet and aflatoxin B<sub>1</sub> toxicity in rats*, Toxicol Appl Pharmacol, 20, 113-121.
- Sahoo PK, Chattopadhyay SK and Charan K (1993a)** *Biochemical alterations in experimentally induced chronic aflatoxicosis in rabbits*, Indian Vet J, 70, 909-913.
- Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K and Sikdar A (1993b)** *Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits*, Indian J Anim Sci, 63(3), 268-273.
- Sandıkçı M ve Çelik İ (2000)** *Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetatın bu organ üzerine etkisi*, Vet Bil Derg, 16 (2), 81-88.
- Schalm OW, Jain NC and Carrol EJ (1975)** *Normal values in blood morphology*, In: Veterinary Hematology, 123-142, 3<sup>rd</sup>. Edition, Lea and Febiger Co, Philadelphia.

- Sengstag C (1997)** *The molecular mechanism of aflatoxin B<sub>1</sub>-induced liver cancer: Is mitotic recombination involved?*, Mol Carcinogenesis, 19, 147-152.
- Seymour GJ, Dockrell HM and Greenspan JS (1978)** *Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease*, Clin Exp Immunol, 32, 169-178.
- Shank RC, Johnson DO, Tanticheroenyos P, Wooding WL and Bourgeois CH (1971)** *Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the Macaque monkey*, Toxicol Appl Pharmacol, 20, 227-231.
- Sharby TF (1978)** *Kanatlılarda mikotoksikozis*, Çeviren: Ersin İstanbulluoğlu, Vet Hekim Derg, 48(2), 47-51.
- Sharlin JS, Howarth B, Thompson FN and Wyatt RD (1981)** *Decreased reproductive potential and reduced feed consumption in mature White Leghorn males fed aflatoxin*, Poult Sci, 60, 2701-2708.
- Shiojiri N and Takashi M (1991)** *Lymphoid follicle formation in the bursa of Fabricius of the chick embryo*, J Anat, 175, 237-249.
- Singh GSP, Chauhan HVS, Jha GJ and Singh KK (1990)** *Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks*, J Comp Pathol, 103, 399-410.
- Slowik J, Graczyk S and Madej JA (1985)** *The effect of a single dose of aflatoxin B<sub>1</sub> on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings*, Folia Histochem Cytobiol, 23(1-2), 71-80.
- Slowik J, Kuryszko J, Graczyk S and Kuprowski M (1990)** *Histochemical studies of acid phosphatase in the bursa-dependent lymphoid tissue of the spleen of chickens after bursectomy and stimulation with ovine erythrocytes*, Pol Arch Weter, 30(3-4), 75-87.
- Sorenson WG, Gerberick GF, Lewis DM and Castranova V (1986)** *Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro*, Environ Health Perspec, 66, 45-53.
- Steward RG, Skeeles JK, Wyatt RD, Brown J, Page RK, Russel ID and Lukert PD (1985)** *The effect on aflatoxin on complement activity in broiler chickens*, Poult Sci, 64, 616-619.
- Stewens A and Bancroft JD (1990)** *Proteins and nucleic acids*, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. by JD Bancroft and A Stewens, 177-213, 3<sup>rd</sup> Edition, The Bath Press, Avon.

- Stoloff L, Verret MJ, Dantzman J and Reynaldo EF (1972)** *Toxicological study of aflatoxin P<sub>1</sub> using the fertile chicken egg*, Toxicol Appl Pharmacol, 23, 528-531.
- Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL and Shotwell OL (1983)** *Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B<sub>1</sub>*, Am J Vet Res, 44(9), 1750-1752.
- Sudhakar BV (1992)** *The carry-over effect of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs and liver of chicken*, Indian Vet J, 69, 1061-1062.
- Suliman HB, Mohammed AF, Awadelsied NA and Shommein AM (1987)** *Acute mycotoxicosis in sheep: Field cases*, Vet Hum Toxicol, 29(3), 241-243.
- Şahin K ve Sarı M (1996)** *Elazığ yöresinde yaygın olarak kullanılan yemlerin bakteri ve mantar florası üzerine bir araştırma*, FÜ Sağlık Bil Derg, 10(2), 251-258.
- Şanlı Y (1995)** *Mikotoksinler*, Özel Toksikoloji Kitabı, Ed. Sezai Kaya, 283-328.
- Tamaoki N and Essner E (1969)** *Distribution of acid phosphatase, β-glucuronidase and N-acetyl-β-glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents*, J Histochem Cytochem, 17(4), 238-243.
- Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı (1997)** *Aflatoksin kontrolüne dair tebliğ*, Resmi Gazete, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.
- Thaxton JP, Tung HT and Hamilton PB (1974)** *Immunosuppression in chickens by aflatoxin*, Poult Sci, 53, 721-725.
- Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RD and Miller BL (1983)** *Aflatoxicol and aflatoxin B<sub>1</sub> and aflatoxin M<sub>1</sub> in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed*, Poult Sci, 62, 2176-2182.
- Tuncer N (1987)** *Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması*, Etlik Vet Mik Derg, 6(1), 101-116.
- Tuzcu M (1999)** *Aspergillus parasiticus NRJ.1. 2999 suşu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular*, Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Van Halderen A, Green JR, Marasas WFO, G'thiel PG and Stockenstrom S (1989)** *A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the Western Cape Province*, Tydski S Afr Vet Ver, 60(4), 210-211.
- Verret MJ, Marliac JP and McLoughlin J (1964)** *Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity*, J AOAC, 47(6), 1003-1006.
- Veselý D and Veselá D (1991)** *The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals*, Vet Med Praha, 36(3), 175-181.

- Vidyasagar T, Sujatha N and Sashidhar RB (1997)** *Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct in rat liver by enzyme immunoassay*, Analyst, 122, 609-613.
- Washburn KW, Wyatt RD, Potts PL and Lanza GM (1985)** *Effects and mechanism of aflatoxin on variation in shell strength*, Poult Sci, 64, 1302-1305.
- Wilson R, Ziprin R, Ragsdale S and Busbee D (1985)** *Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin*, Toxicol Letters, 29, 169-176.
- Wong ZA and Hsieh DPH (1980)** *The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B<sub>1</sub> in the monkey, rat and mouse*, Toxicol Appl Pharmacol, 55, 115-125.
- Wulff JC, Sale GE, Deeg HJ and Storb R (1981)** *Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes*, Exp Hematol, 9(8), 85-870.
- Yakışık M (1992)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> verilmiş Newcastle'a aşılı civcivlerde karaciğer paranzimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler*, UÜ Vet Fak Derg, 11(2), 43-51.
- Yam LT and Mitus WJ (1968)** *The lymphocyte  $\beta$ -glucuronidase activity in lymphoproliferative disorders*, Blood, 61(4), 480-489.
- Yang TJ, Jantzen PA and Williams LF (1979)** *Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T- and B lymphocytes*, Immunology, 38, 85-93.
- Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ and Rappaport H (1982)** *Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes*, Am J Clin Pathol, 78(2), 141-149.
- Yıldız N ve Bircan H (1991)** *Araştırma ve Deneme Metodları*, Atatürk Üniversitesi Yayınları 697, Ziraat Fakültesi No: 305, Ders Kitapları Serisi No: 52, ERZURUM.
- Zicca A, Zeprini A, Cadoni A, Franzi AT, Ferrarini M and Grossi CE (1981)** *Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human T<sub>m</sub> lymphocytes*, Am J Pathol, 105(1), 40-46.

## 9.ŞEKİLLER



Şekil 1: Embriyonal dönemin onuncu gününde kontrol-1 (solda) ve 20 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait (sağda) embriyolar görülmekte. AFB<sub>1</sub> verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgin olarak görülmektedir.



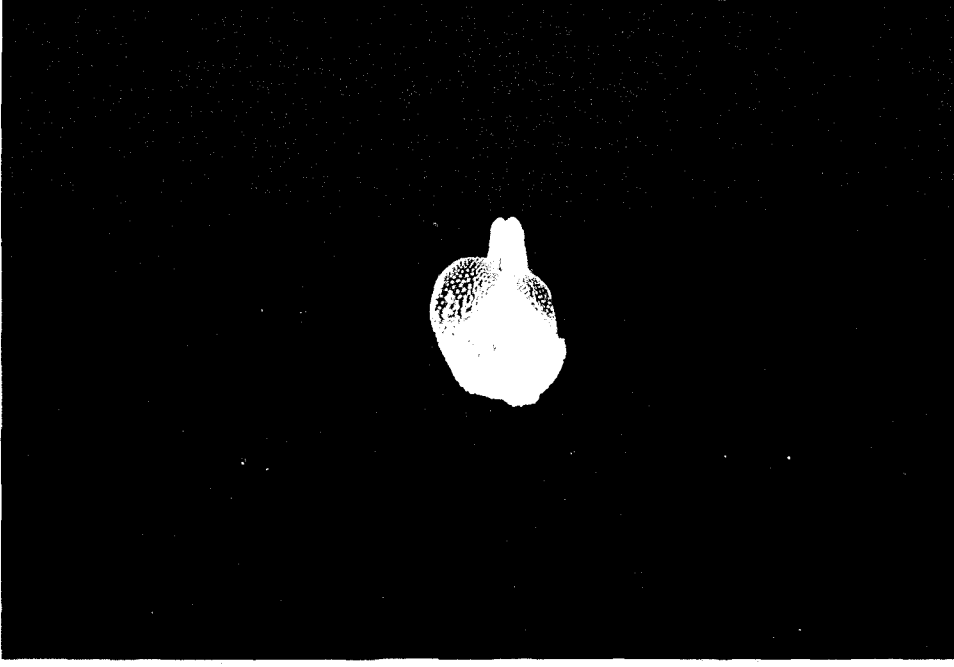
Şekil 2: Embriyonal dönemin onüçüncü gününde 20 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait (solda) ve kontrol-1 grubuna ait (sağda) embriyolar görülmekte. Soldaki (20 ng AFB<sub>1</sub> ) embriyodaki gelişme geriliği belirgin biçimde dikkati çekmektedir.



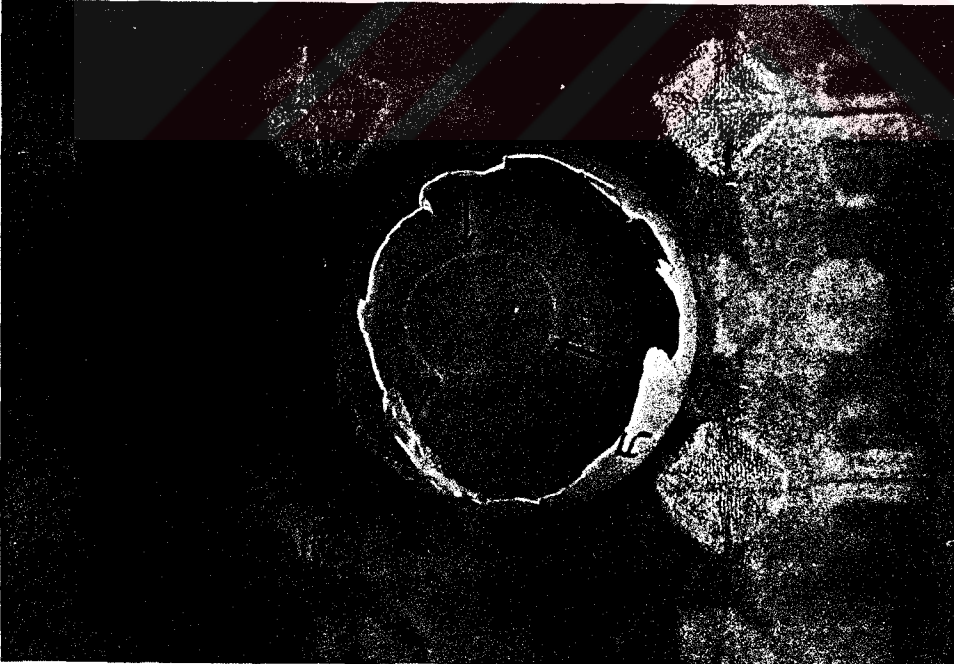
Şekil 3: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyo. Karın duvarının kapanmaması sonucu bağırsaklar, dalak ve karaciğerin dışarıda olduğu (Schistosoma reflexum) görülmekte, d: Dalak, k: Karaciğer, b: Bağırsaklar.



Şekil 4: 20 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onikinci gününe ait bir embriyoda makas gaga görülmekte.

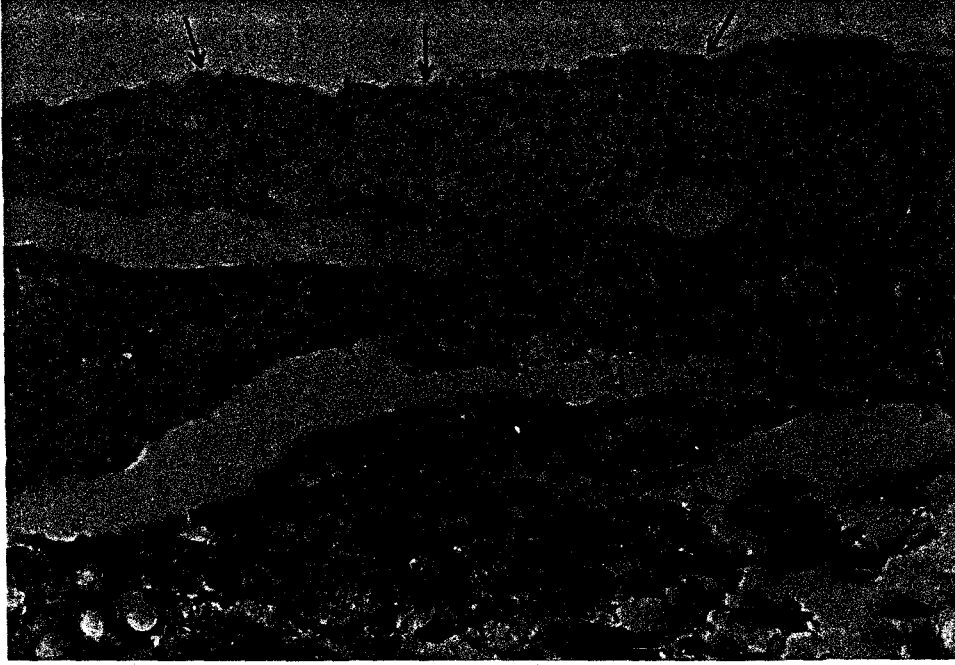


Şekil 5: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait 12 günlük bir embriyoda unilateral mikroftalmi görülmekte.

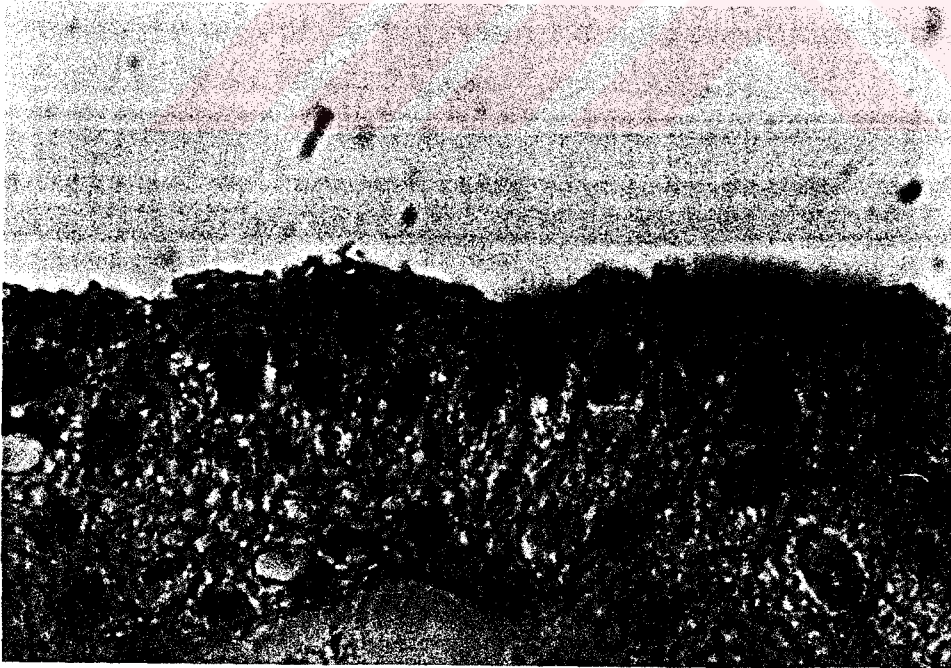


Şekil 6: 20 ng/yumurta dozunda AFB<sub>1</sub> verilen ve inkübasyonun yedinci gününde açılan bir yumurta. Aşırı çoğalan ve area pellucida'yı kuşatan area opaca hücrelerinin oluşturduğu hücresel halka (oklar) görülmektedir.

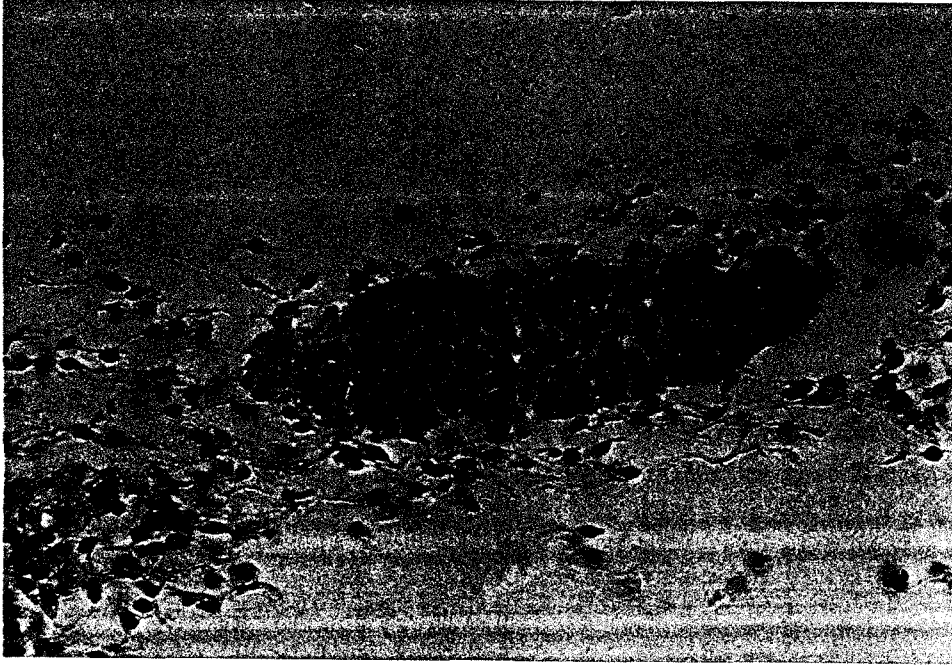




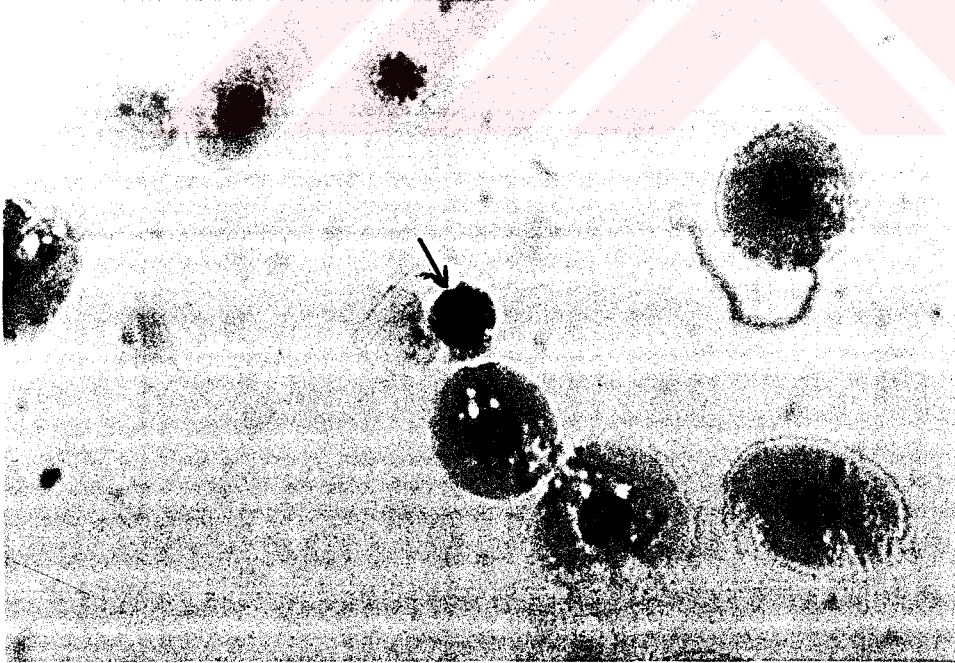
Şekil 7: Hücresel halka bölgesinden alınan bir kesit. Aşırı çoğalan area opaca hücreleri (oklar) görülmektedir. Üçlü boyama, X576.



Şekil 8: Hücresel halka bölgesinden alınan bir başka kesit. Aşırı çoğalan area opaca hücreleri görülmekte. Üçlü boyama, X1440.



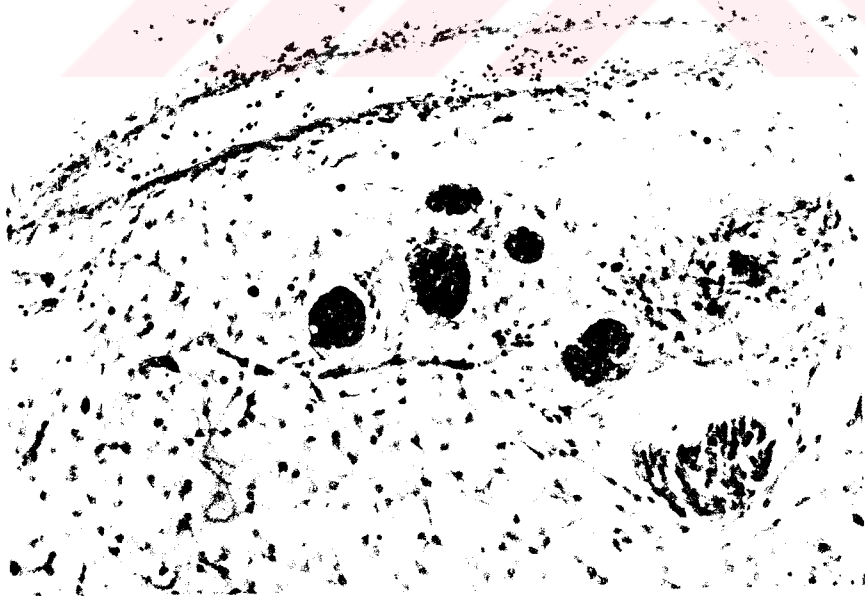
Şekil 9: Kontrol-I grubuna ait 7 günlük bir embriyonun timus lobu taslağından alınan bir kesit. Taslak içerisine infiltre olarak gruplaşan bazofilik hücrelerin (oklar) arasında yer alan bir mitotik figür (ok başı) görülmektedir. Üçlü boyama, X460.



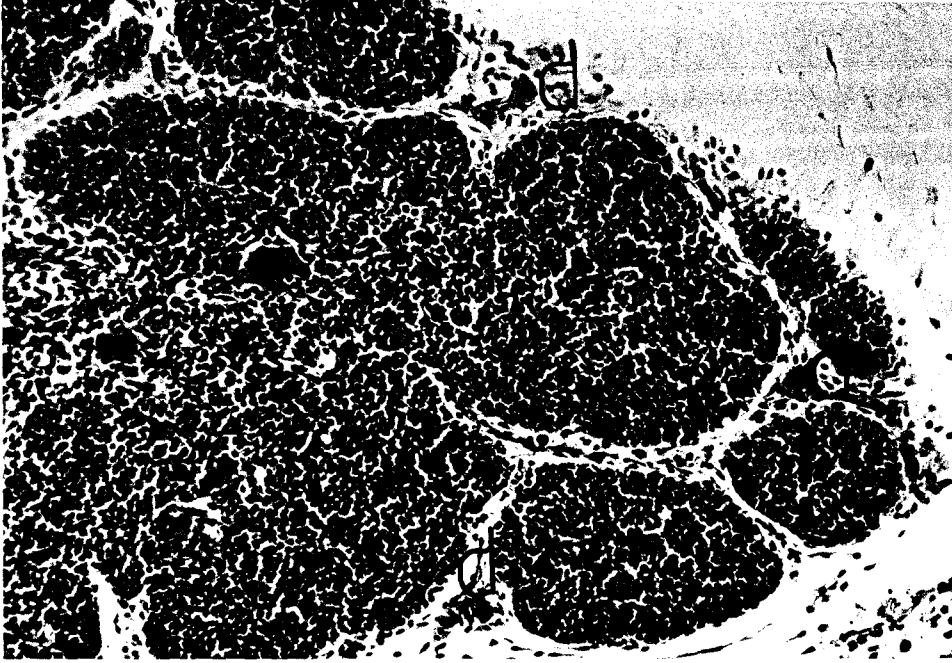
Şekil 10: İnkübasyonun yedinci günündeki bir embriyodan alınan kanda iri-bazofilik bir hücre (ok) görülmekte. MayGrünwald-Giemsa, X1440.



Şekil 11: Kontrol-1 grubundan elde edilen embriyonal dönemin onuncu günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Geniş mezenkimal alanlarla (oklar) birbirlerinden ayrılmış lopçuklar görülmektedir. Üçlü boyama.X224.



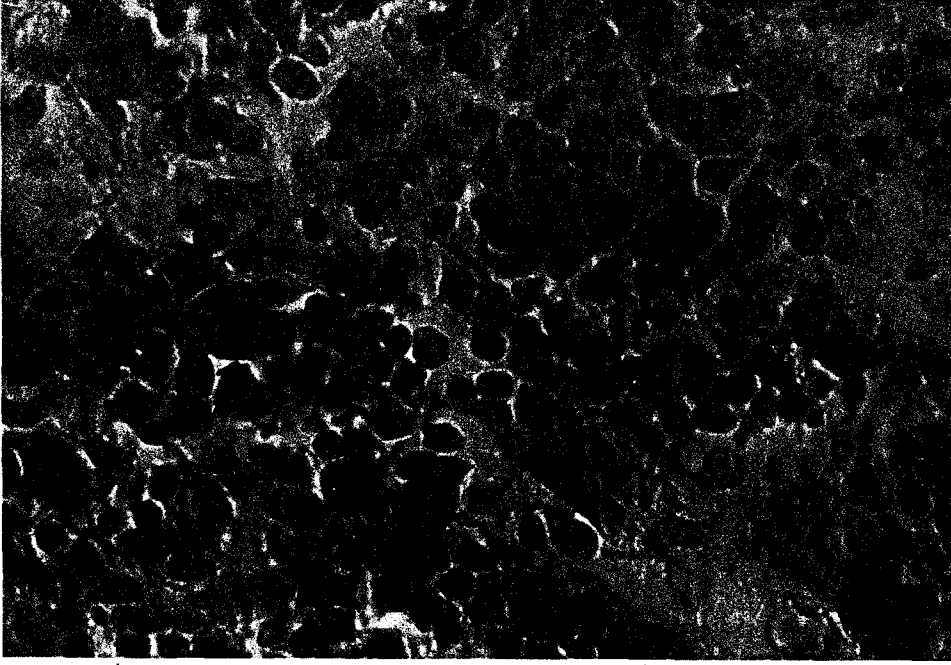
Şekil 12: 20 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait 10 günlük bir embriyonun timus loplarından alınan bir kesit. Organın gelişiminin baskılanmış olduğu ve lopların küçük kaldığı görülmektedir. Pappenheim'in panoptik boyası,X224.



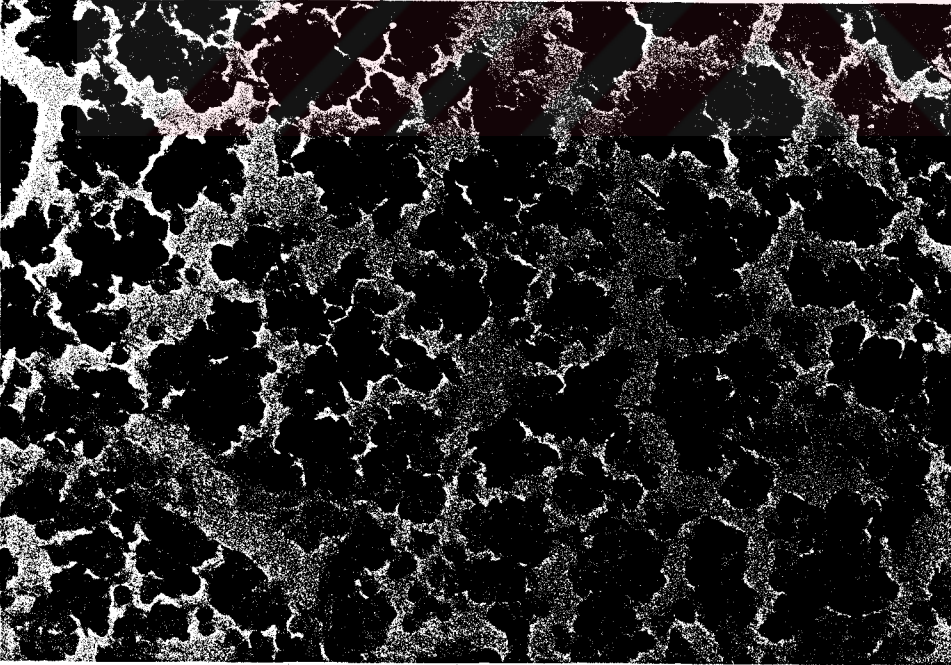
Şekil 13: İnkübasyonun onikinci gününde kontrol-1 grubuna ait bir embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Korteks-medulla ayrımı henüz tam olarak yapılamamakla birlikte damarlaşmanın arttığı (d) ve hücrelerin lenfosit morfoljisine yakın bir görünüm aldıkları görülmekte (oklar). Üçlü boyama, X230.



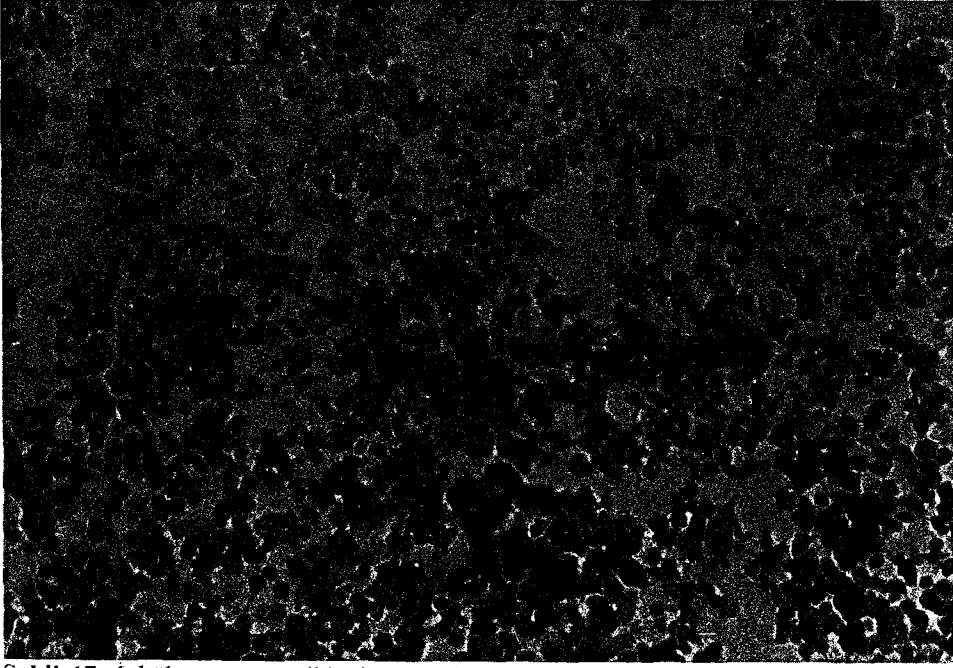
Şekil 14: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait 12 günlük bir embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Loplardaki gelişme geriliği ve vaskülarizasyonun daha zayıf olduğu görülmekte. Üçlü boyama, X230.



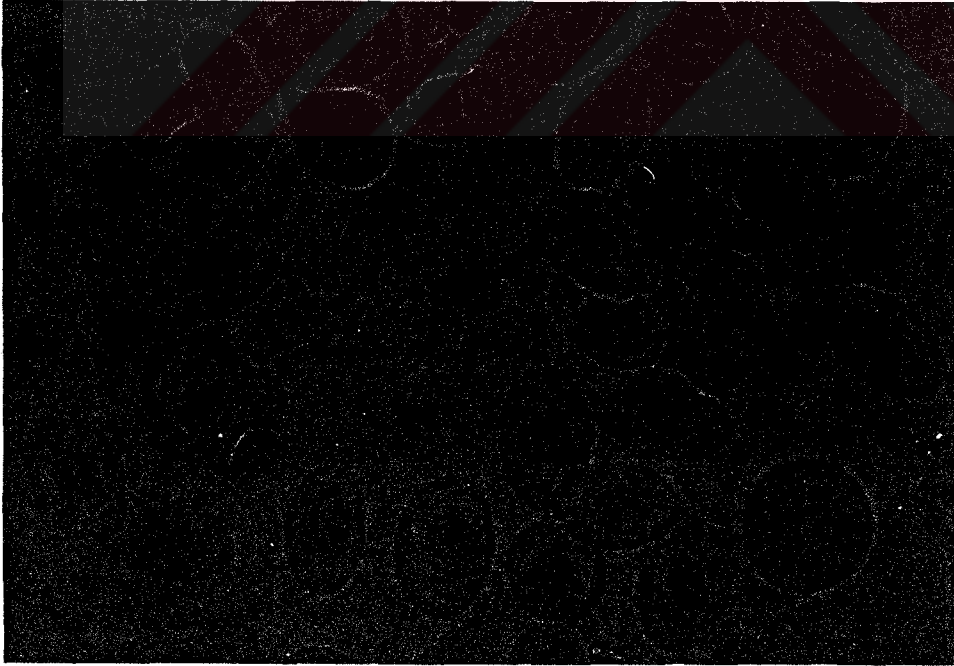
Şekil 15: İnkübasyonun onikinci gününde kontrol-1 grubuna ait bir embriyodan alınan timus lobu kesiti. İleride medullanın şekilleneceği merkezi bölgelerde PAS pozitif reaksiyon veren dejenere retikulum hücreleri (oklar) görülmekte. PAS.X1152.



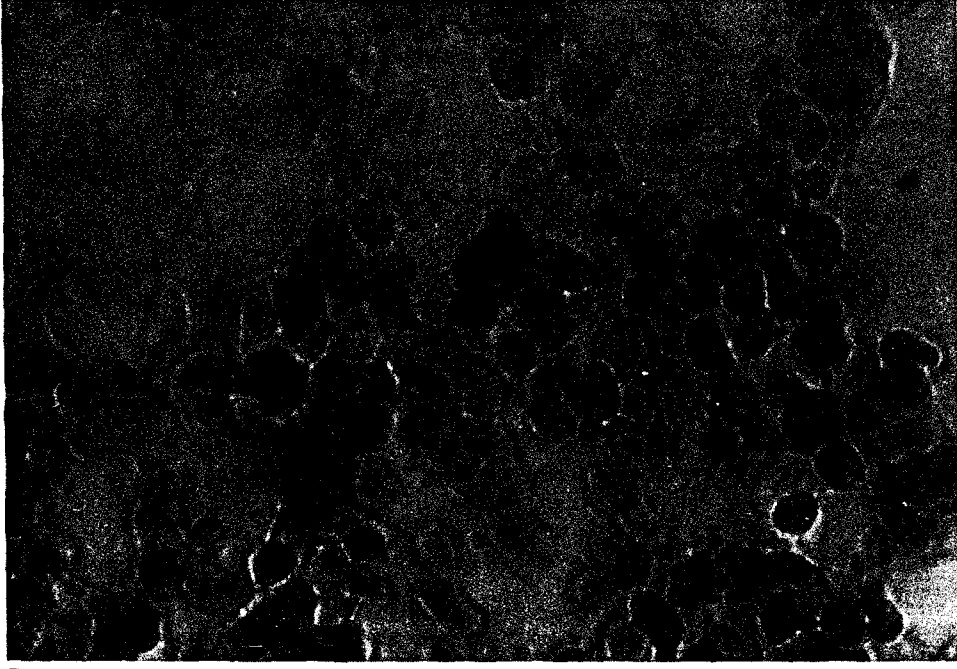
Şekil 16: İnkübasyonun onikinci gününde kontrol-1 grubuna ait bir embriyonun timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Lenfosit morfolojisine sahip birkaç adet ANAE pozitif hücre (oklar) görülmekte. ANAE demonstrasyonu,X460.



**Şekil 17:** İnkübasyonun onikinci gününde kontrol-1 grubuna ait bir embriyonun timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Lenfosit morfolojisine sahip birkaç adet hücrede ACP-az pozitivitesi (oklar) görülmekte. ACP-az demonstrasyonu.X460.



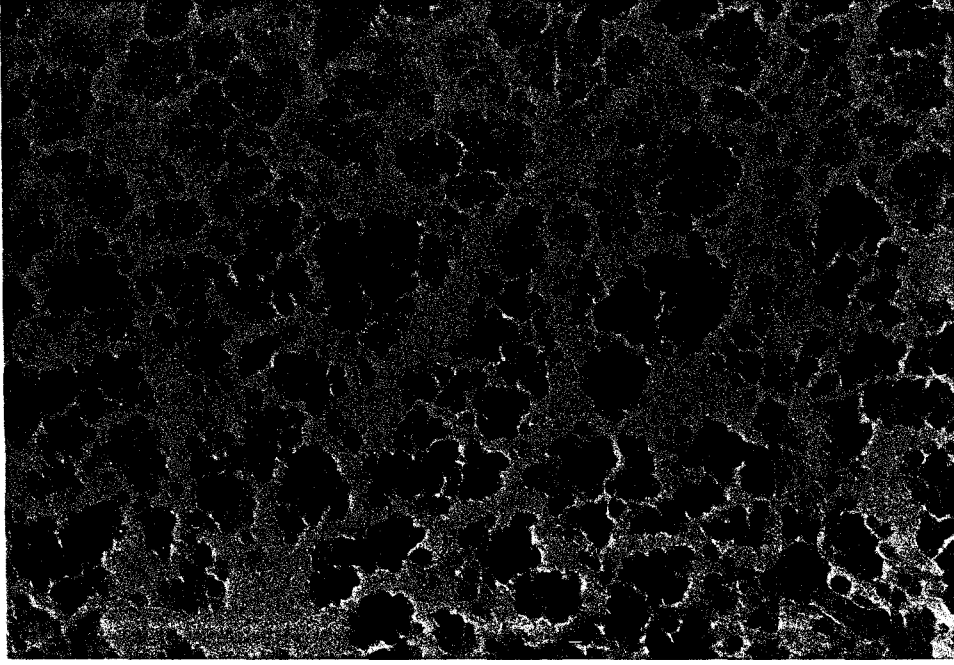
**Şekil 18:** Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyonun perifer kanında lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif bir hücre görülmekte (ok). ACP-az demonstrasyonu.X1440.



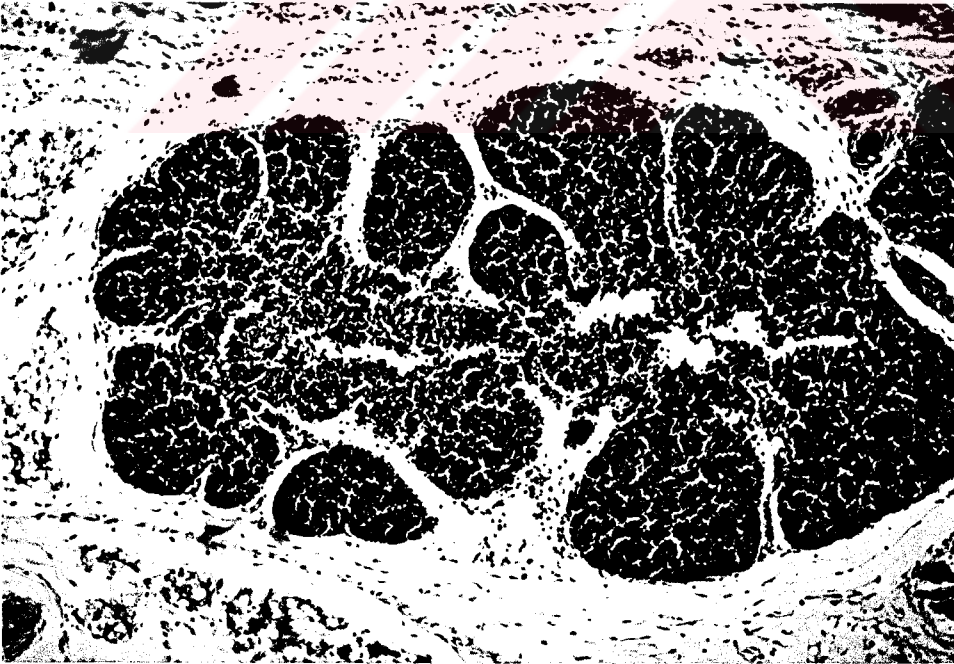
Şekil 19: Kortrol-1 grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan kriyostat kesitinde lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif bir hücre (ok) görülmekte. Pozitivite tipinin hücrenin bir kutbunda iri-kırmızı bir granül tarzında olduğu dikkati çekmekte. ACP-az demonstrasyonu, X1440.



Şekil 20: Kortrol-1 grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyoya ait perifer kanda lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif hücreler (oklar) ile ACP-az pozitif trombositler (çift oklar) görülmekte. Lenfosit morfolojisi gösteren hücrelerde pozitivite tipi hücrenin bir kutbunda bir ya da birkaç adet granül tarzında kendisini göstermekte. ACP-az demonstrasyonu, X1440.

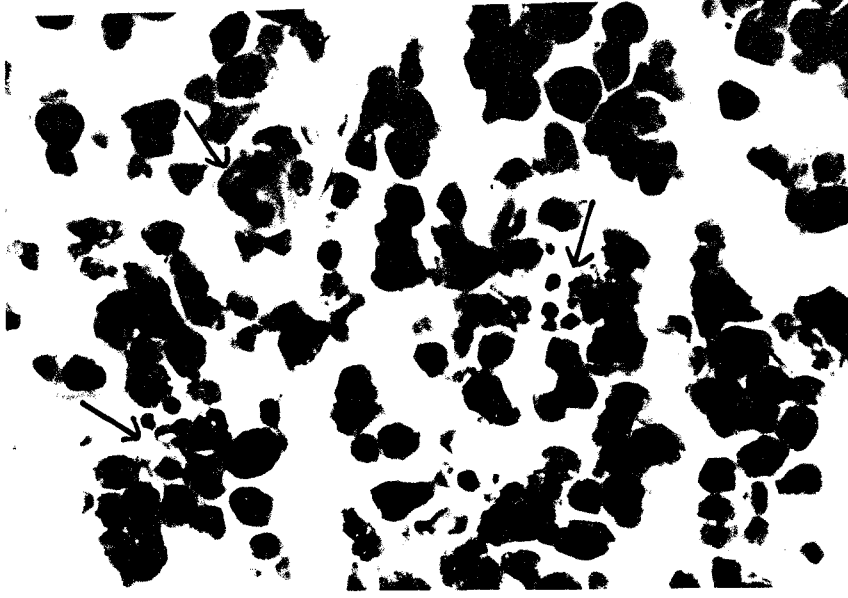


Şekil 21: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan kriyostat kesitinde lenfosit morfolojisine sahip birkaç hücrede (oklar) zayıf BG-az pozitifitesi görülmekte. BG-az demonstrasyonu.X460.

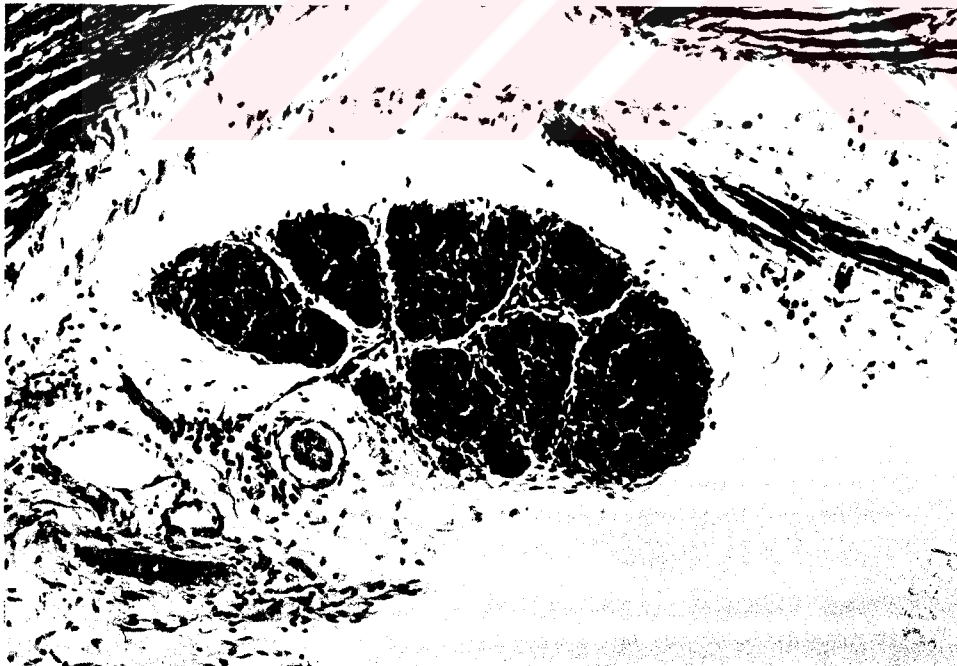


Şekil 22: Kontrol-2 grubuna ait kuluçkanın onüçüncü günündeki embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Korteks-medulla ayırımının az da olsa yapılabildiği bu dönemde medullayı oluşturacak olan hücreden fakir orta bölgenin daha soluk boyandığı görülmekte. Üçlü boyama,X181.

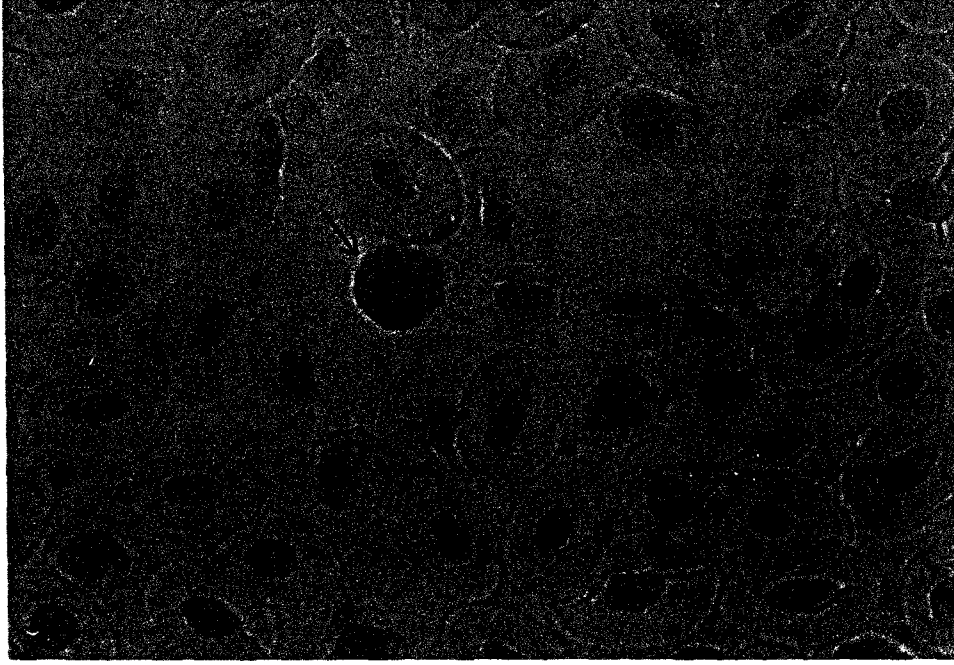




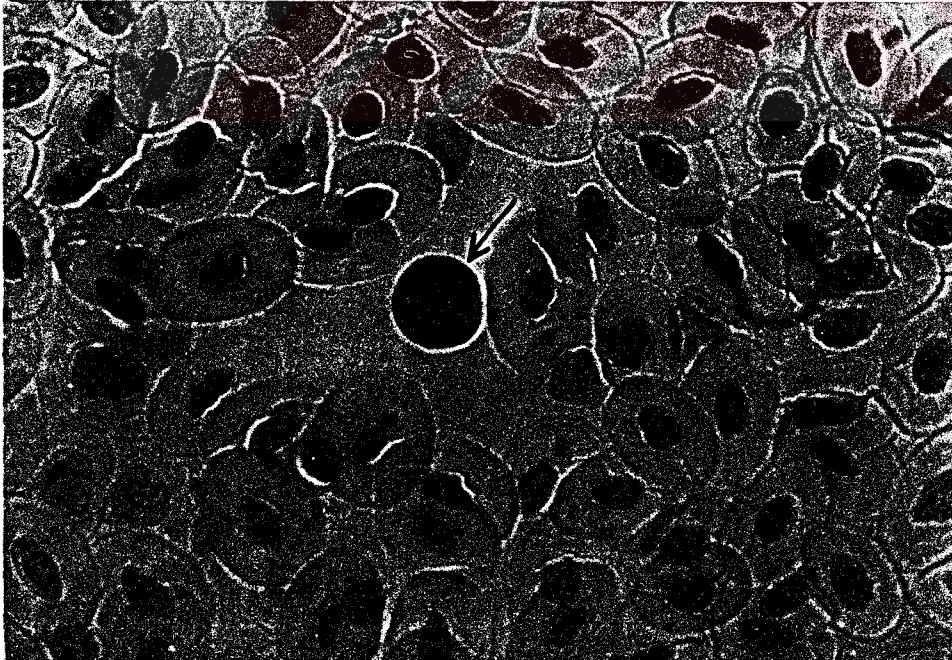
Şekil 23: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Lopçukların özellikle korteks bölgelerinde sitoplazmalarında boya alan granüllere sahip makrofajlar (Tingible Body Macrophage, TBM, oklar) görülmekte. Üçlü boyama, X1720.



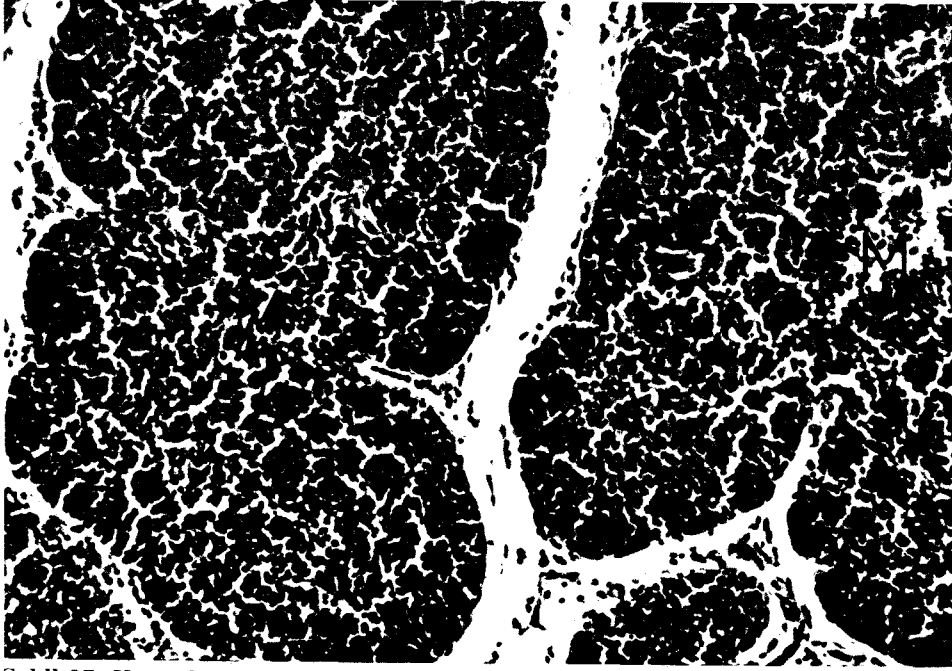
Şekil 24: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait timus lobu kesiti. Gelişme geriliğine bağlı olarak timus lopçuklarının oldukça küçük kaldığı ve korteks-medulla ayırımının yapılamadığı görülmekte. Üçlü boyama, X181.



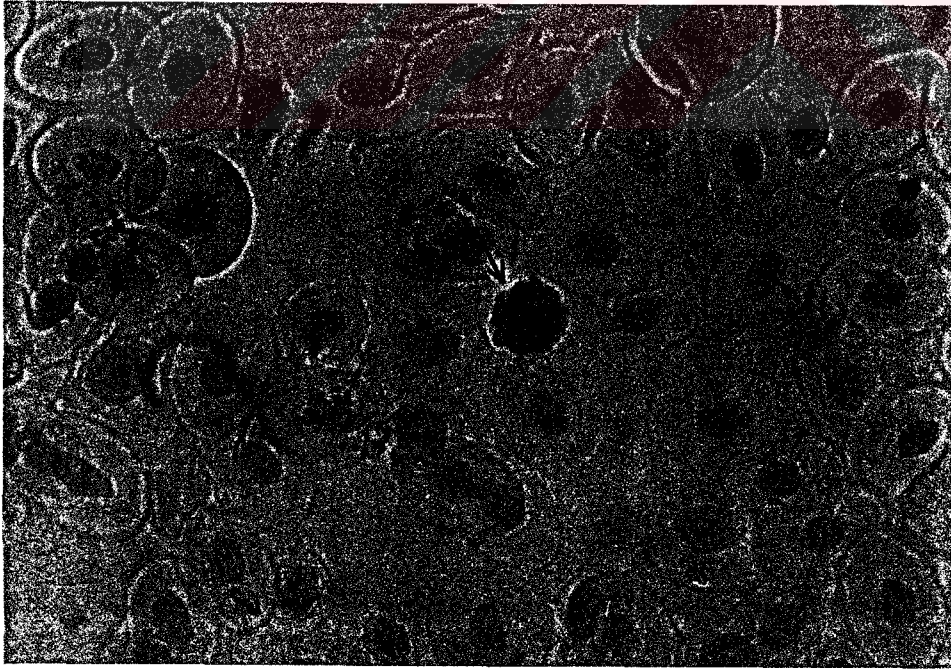
Şekil 25: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait perifer kanda granulositer seriden bir hücre. ACP-az pozitivitesinin sitoplazmada diffüz tarzda olduğu görülmekte (ok). ACP-az demonstrasyonu,X1440.



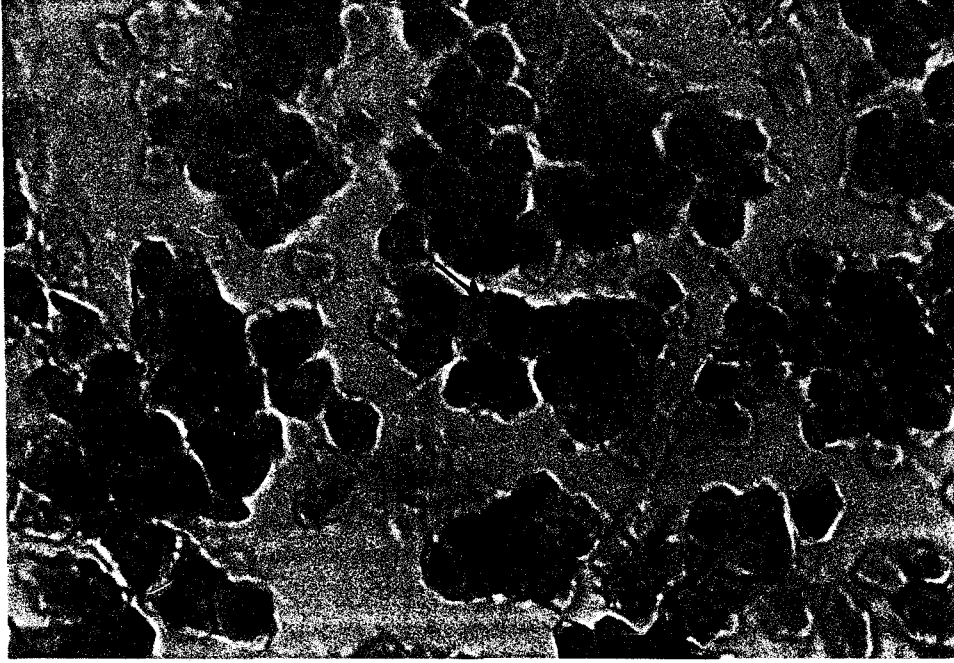
Şekil 26: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait perifer kanda BG-az pozitif bir lenfosit görülmekte (ok). BG-az demonstrasyonu,X1440.



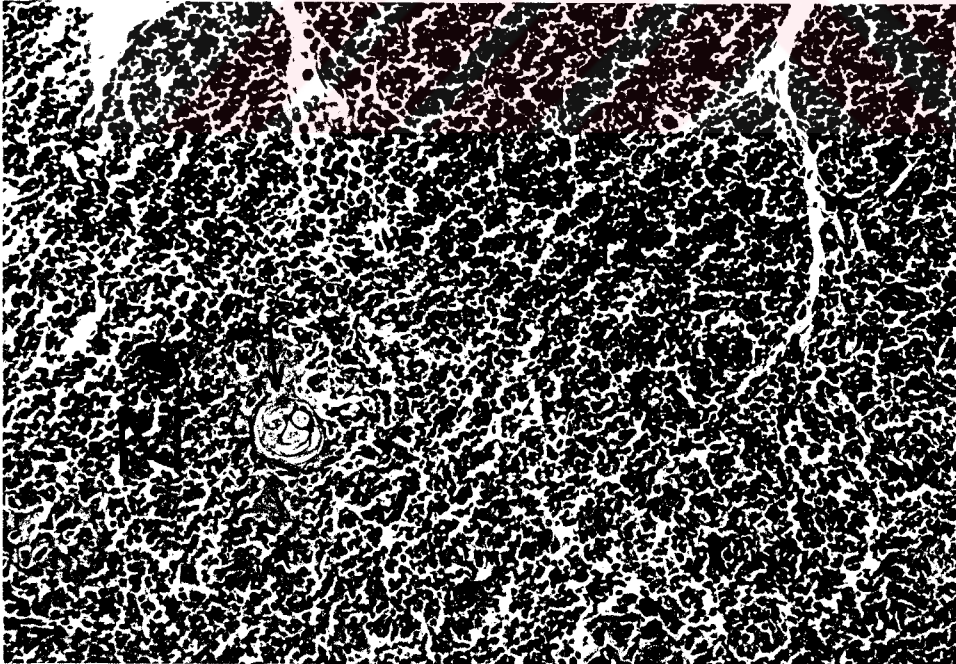
Şekil 27: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyonun timus loplarından alınan bir kesit. Korteks-medulla ayrımının belirgin olduğu bu dönemde korteksin gelişmekte olduğu bölgelerde daha çok küçük tip lenfositlerin lokalize olduğu görülmekte. M: Medulla. Üçlü boyama, X288.



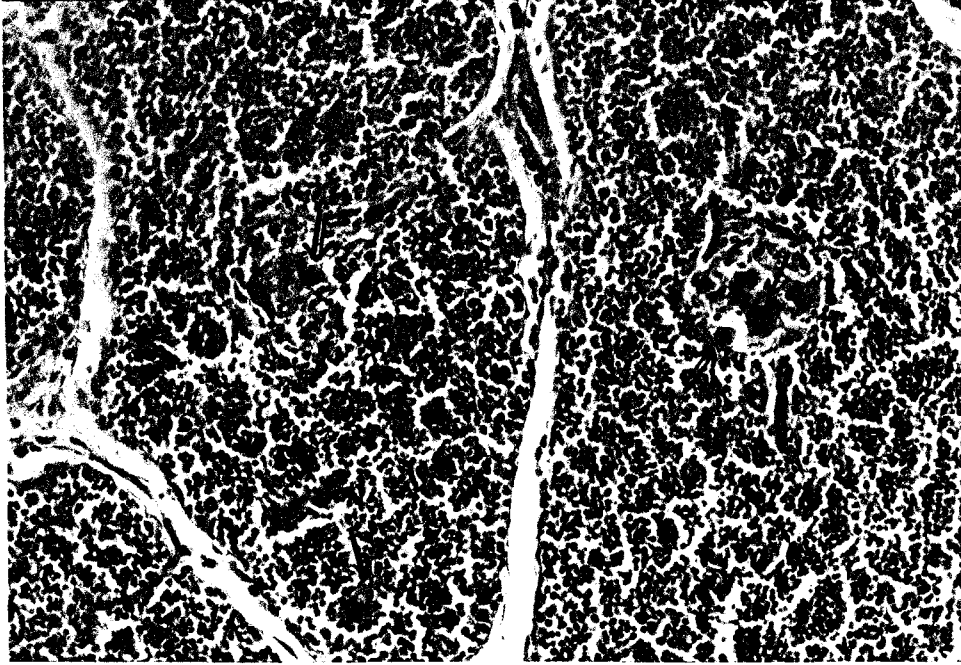
Şekil 28: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyoya ait perifer kanda ACP-az pozitif lenfosit görülmekte (ok). ACP-az demonstrasyonu, X1440.



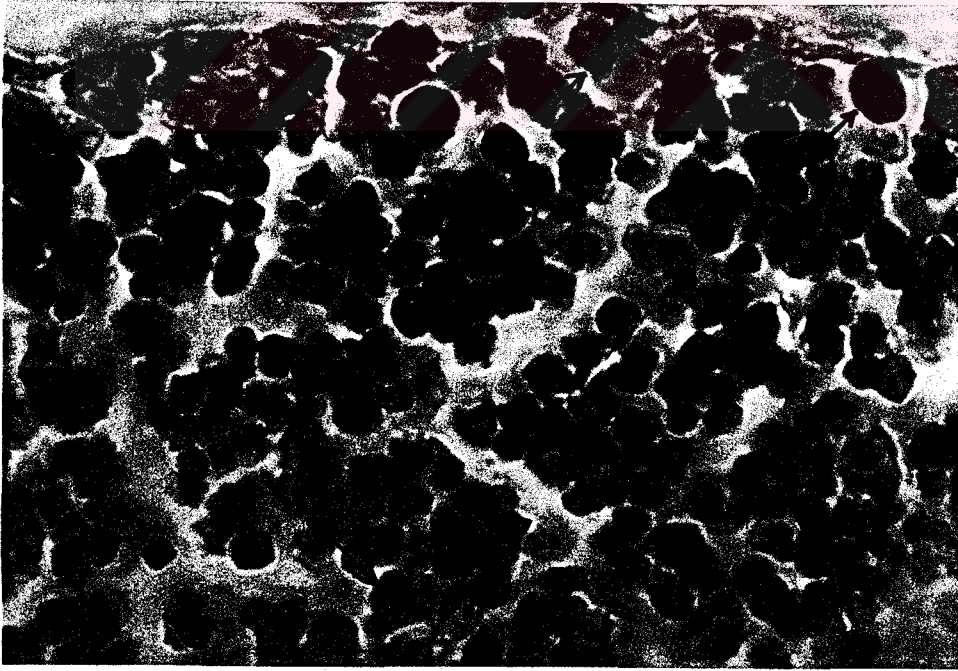
Şekil 29: Kontrol-2 grubuna ait kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan kriyostat kesitinde ACP-az pozitif bir lenfosit (ok) görülmekte. ACP-az demonstrasyonu, X1440.



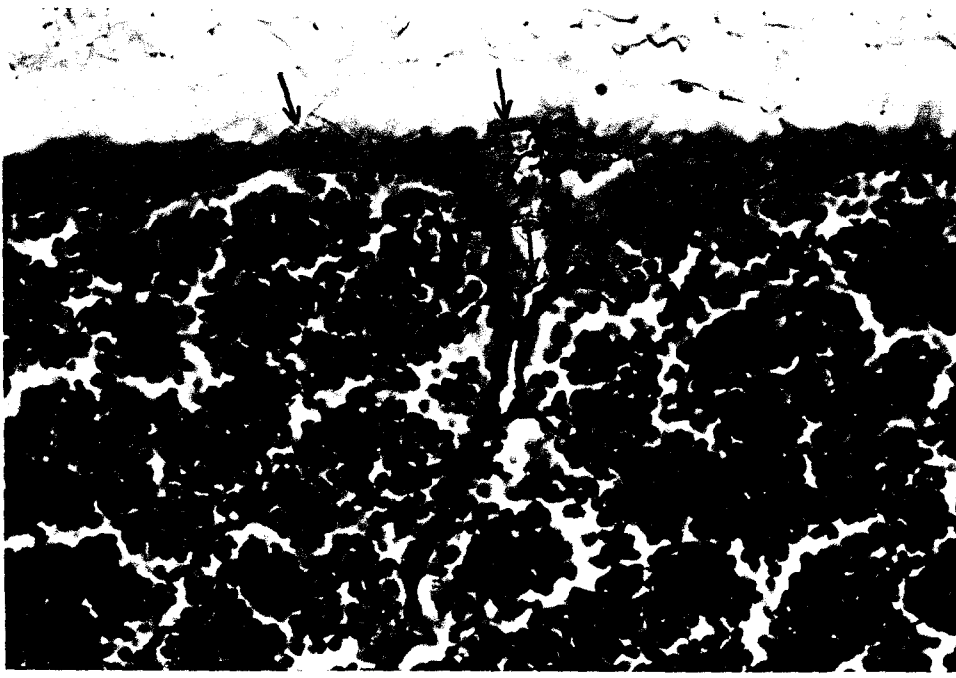
Şekil 30: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun timus lobu kesiti. Kortex (K)-medulla (M) ayırımının net bir şekilde yapılabildiği bu dönemde, medullada dejeneratör retikulum hücrelerinin oluşturduğu bir Hassal cisimciği (ok) görülmekte. Üçlü boyama, X230.



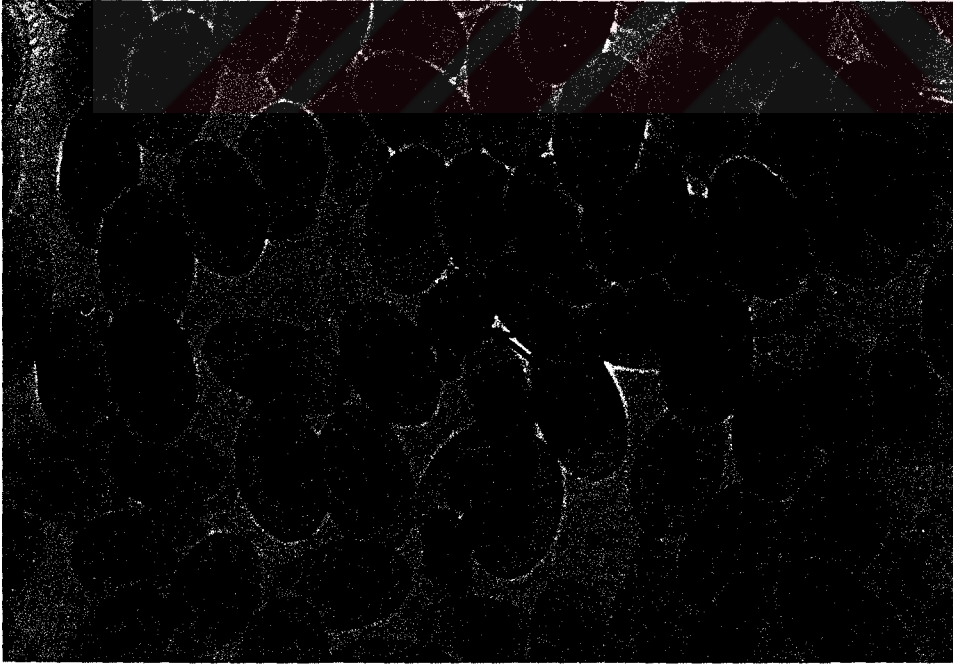
Şekil 31: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyodan alınan timus lobu kesiti. Medulla bölgesinde PAS pozitif reaksiyon veren dejenere retikulum hücreleri (oklar) ile kistik yapılar (çift ok) görülmekte. PAS,X288.



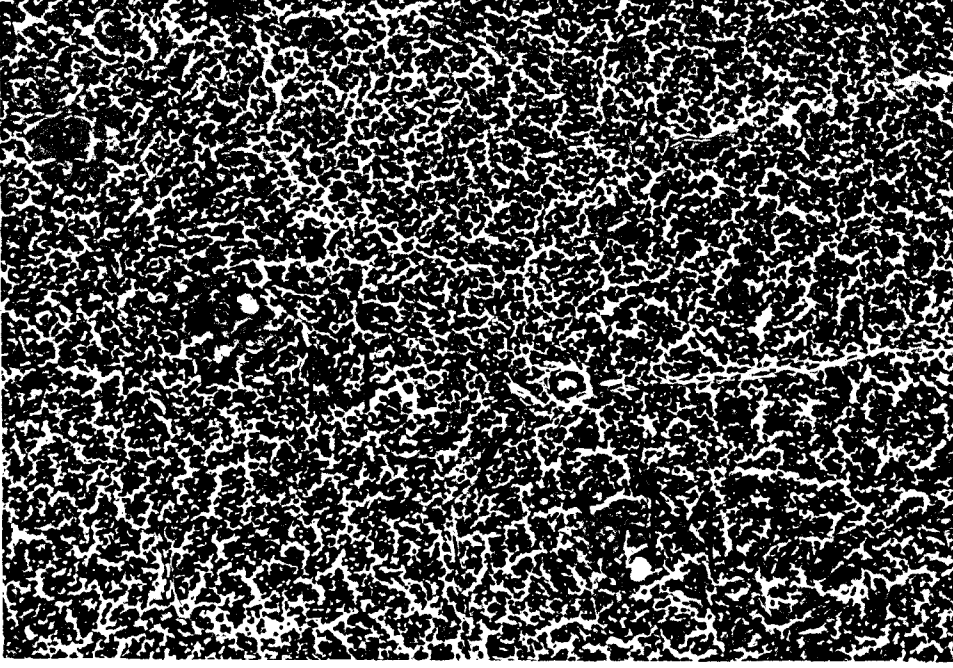
Şekil 32: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun timus lobundan alınan bir kesit. Plazma hücrelerini andıran iri-pironinofilik sitoplazmalı hücreler (oklar) görülmekte. MGP,X1440.



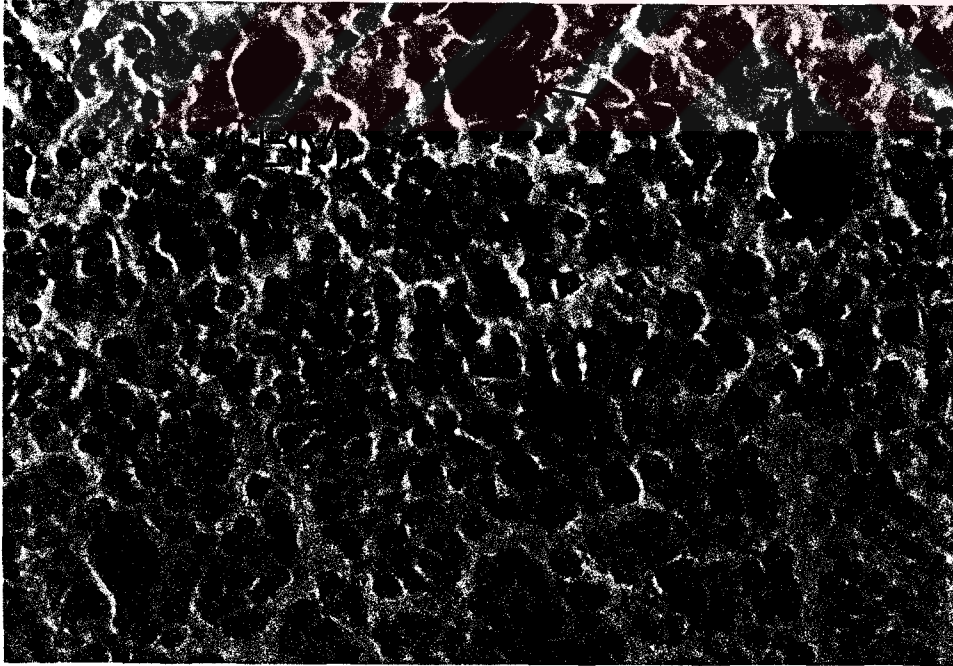
Şekil 33: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun timus loplardan alınan bir kesit. Loplara saran kapsül ile bunun organ içerisine göndermiş olduğu bölmelerdeki retikulum iplikleri (oklar) görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyaması, X576.



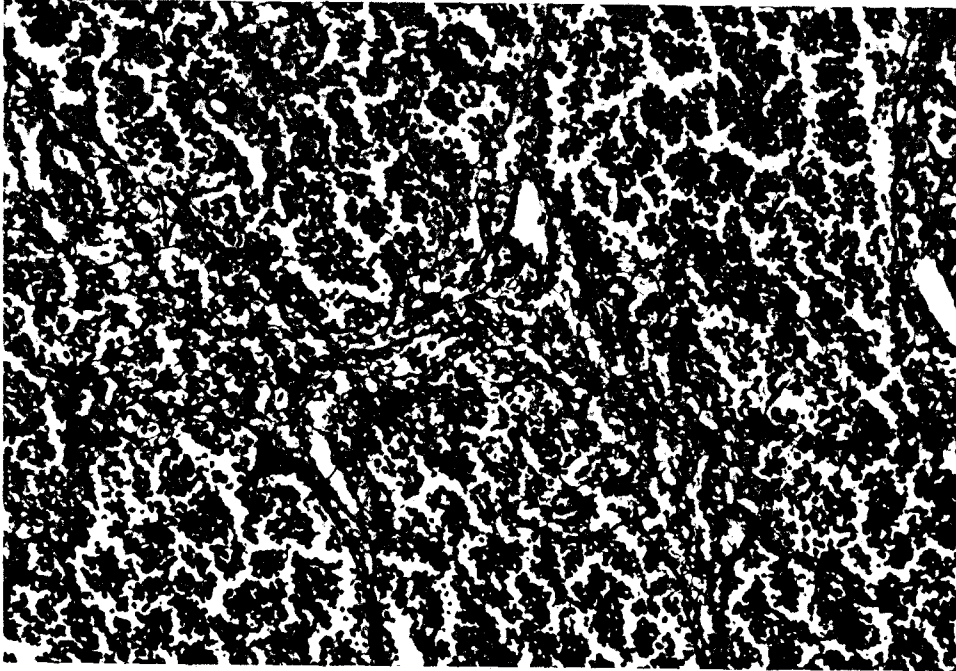
Şekil 34: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun perifer kanında ANAE pozitif bir lenfosit (ok) görülmekte. ANAE demonstrasyonu, X1440.



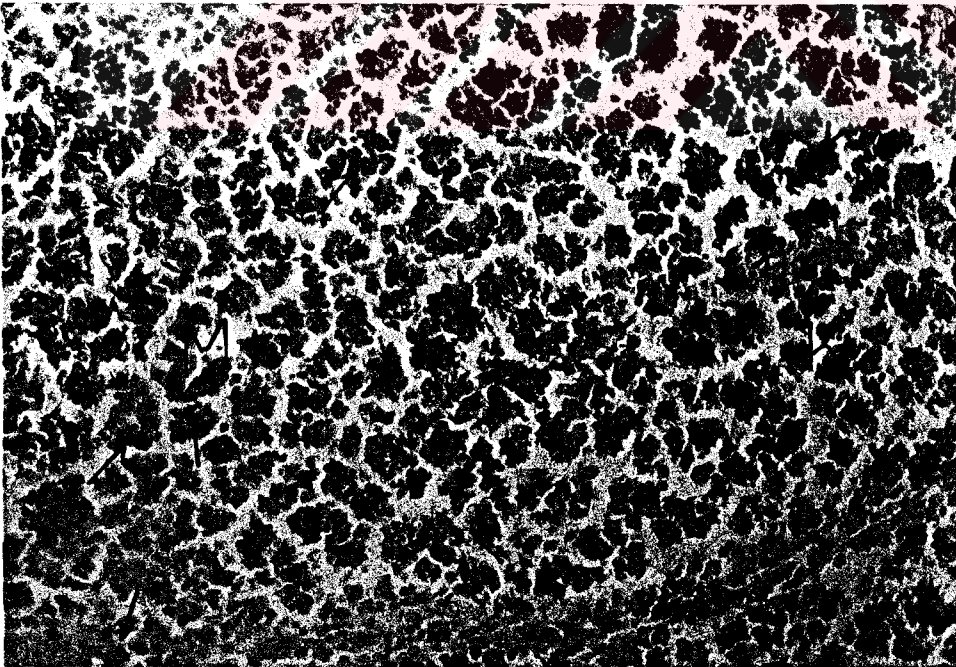
Şekil 35: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan kesit. Histolojik gelişimini tamamlamış olan organın medulla bölgesinde (M) kistik yapıların da irileşmiş olduğu görülmekte (oklar). Üçlü boyama, X230.



Şekil 36: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan kesit. Sitoplazmalarında fagosite edilmiş apoptotik cisimcikler oldukları düşünülen yapıları içeren (oklar) makrofajlar (Tingible Body macrophage, TBM) görülmekte. Pappenheim'in panoptik boyaması, X1152.

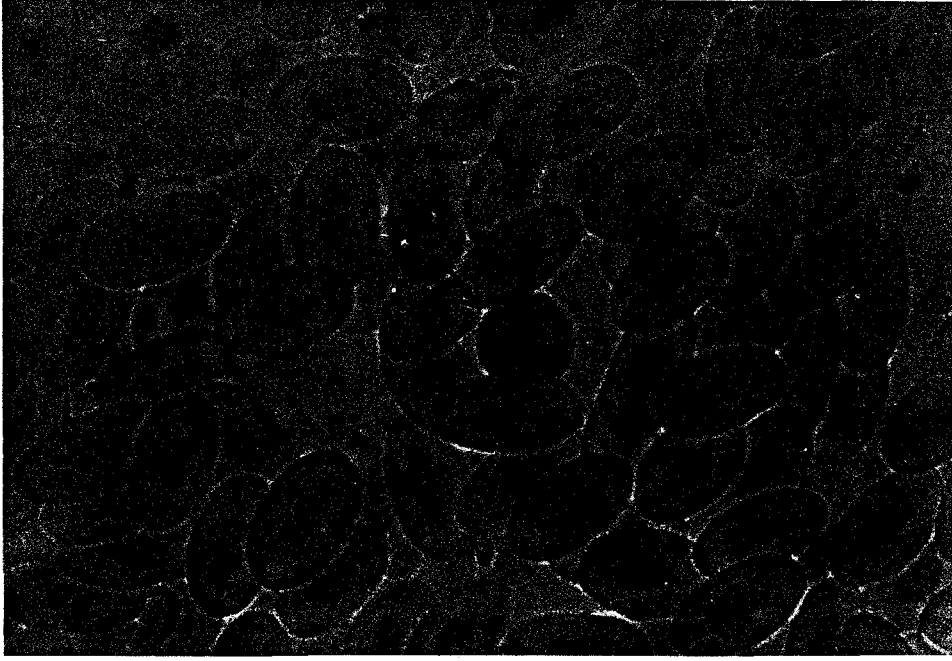


Şekil 37: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-I grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan bir kesit. Lopçuklar arasındaki bağ doku bölgesinde retiküler iplikleri ağının geliştiği ve yaygınlaştığı (oklar) görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyaması.X288.

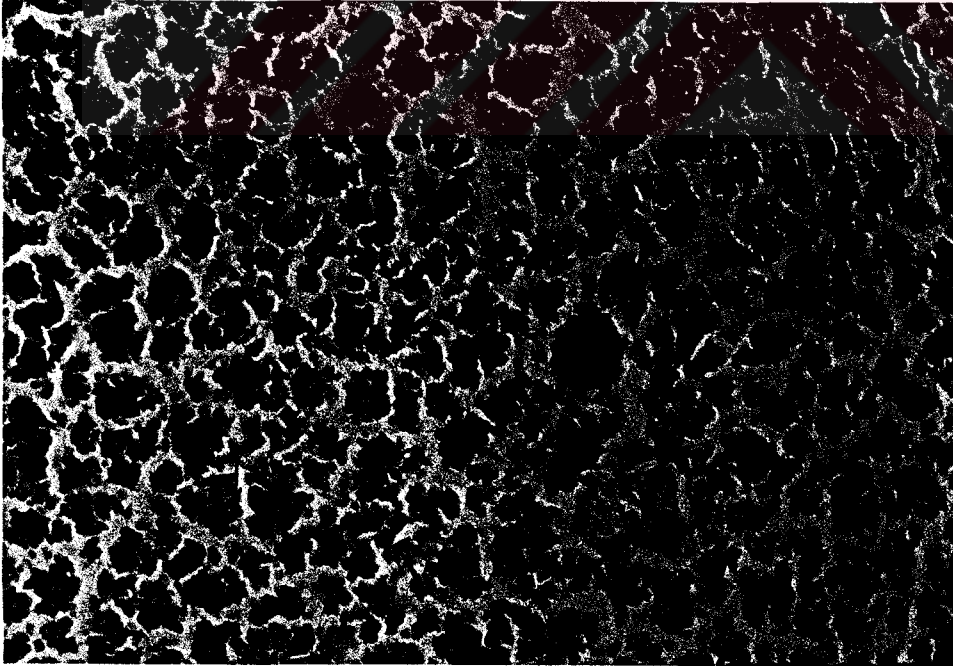


Şekil 38: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-I grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Hem korteks (K) ve hem de medulla (M) bölgesinde ACP-az pozitif lenfositler (oklar) ile sitoplazmalarında diffüz pozitiviteye sahip makrofaj ve retikulum hücreleri (ok başları) görülmekte. ACP-az demonstrasyonu,X230.

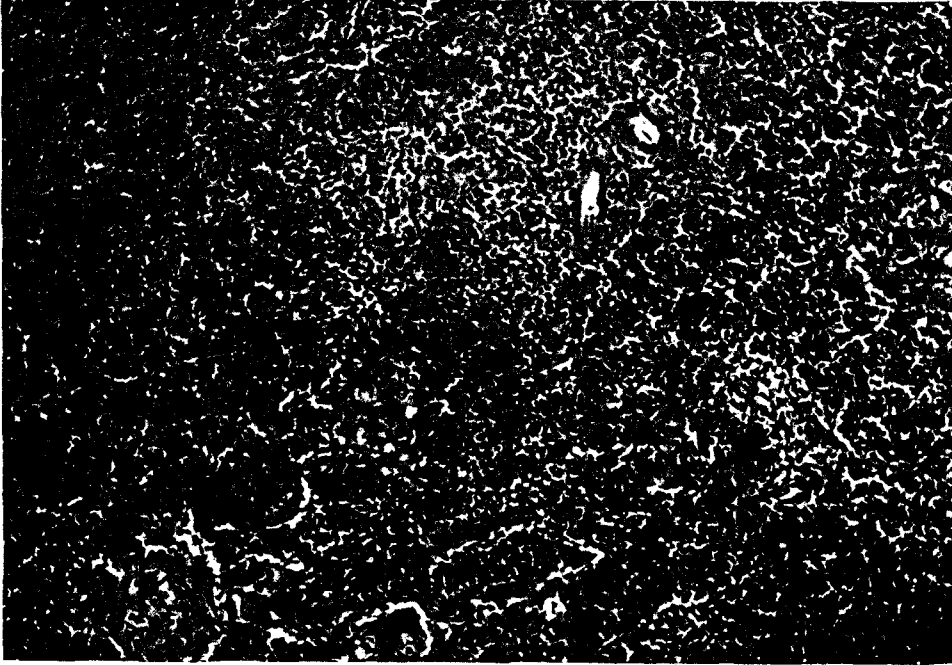




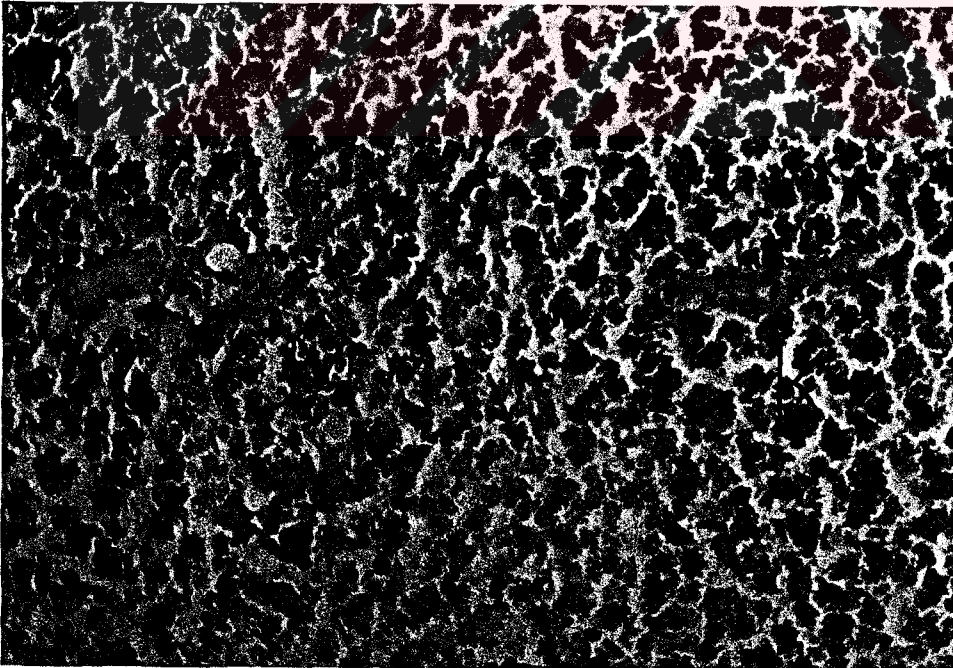
Şekil 39: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin perifer kanında BG-az pozitif bir monosit (ok). Pozitivite tipinin sitoplazmada diffüz tarzda olduğu görülmekte. BG-az demonstrasyonu,X1440.



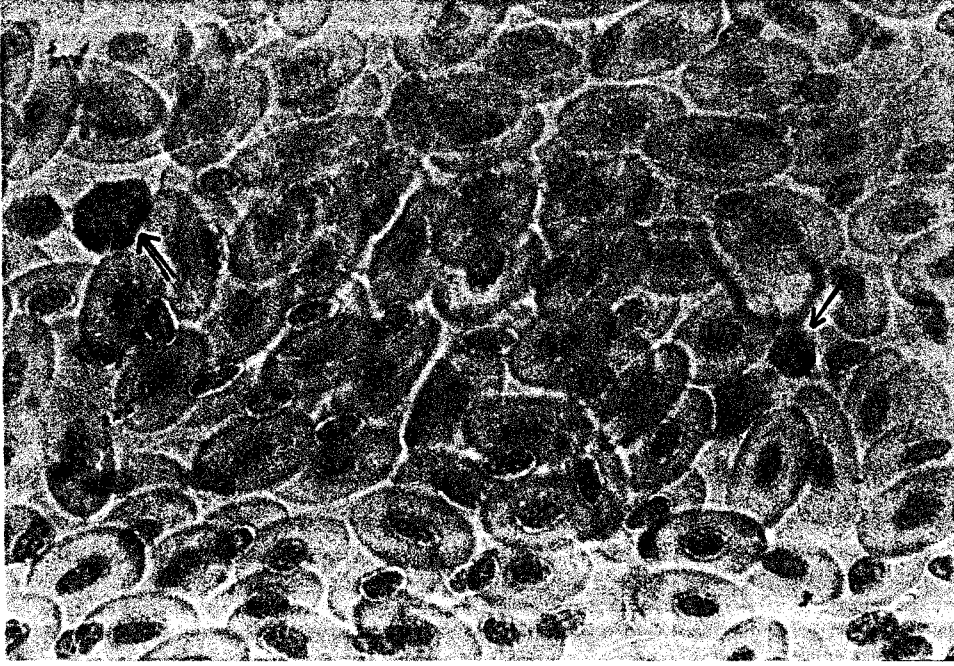
Şekil 40: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Az sayıda BG-az pozitif lenfosit (oklar) görülmekte. BG-az demonstrasyonu,X288.



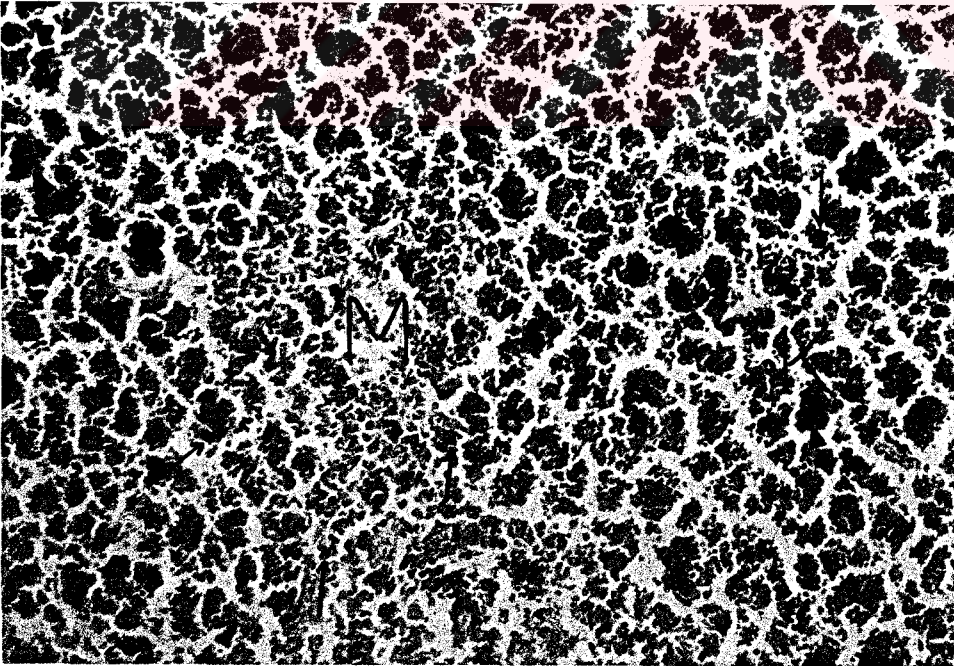
Şekil 41: Kuluçkadan çıkışı takip eden dördüncü hafta sonunda kontrol-1 grubuna ait bir civcivin timus lobundan alınan bir kesit. Lopların medulla (M) bölgelerindeki kistik yapılar (k) ile bunların ortalarında yer alan dejenere lenfosit ve granülositler görülmekte. Üçlü boyama,X230.



Şekil 42: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Çoğunlukla medullada (M) yerleşim gösteren ANAE pozitif lenfositler (oklar) ile sitoplazmalarında diffuz pozitiviteye sahip olan makrofaj ve retikulum hücreleri (ok başları) görülmekte. K (korteks), ANAE demonstrasyonu,X230.



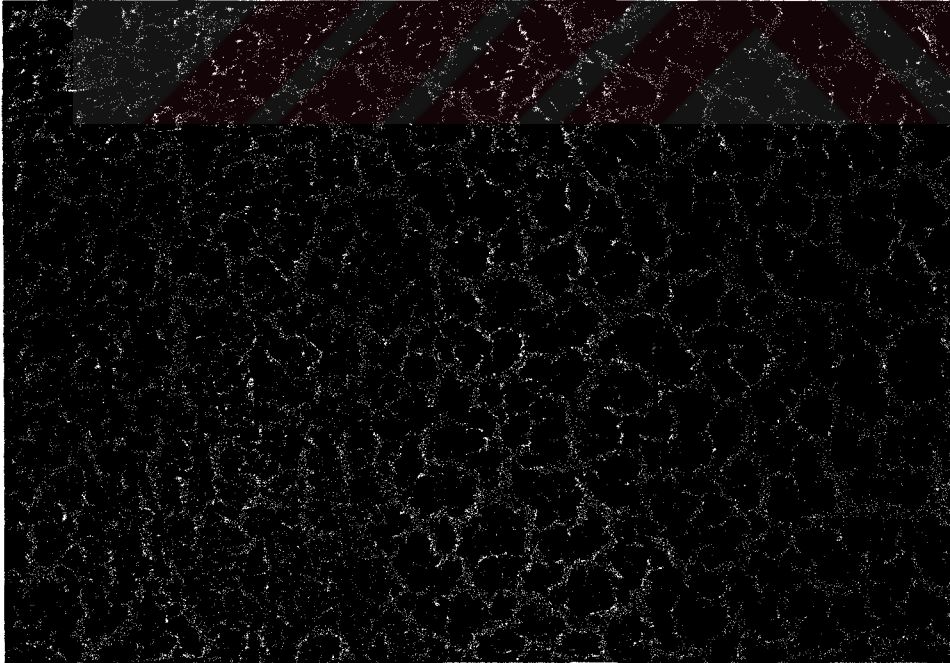
Şekil 43: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivden alınan perifer kanda ACP-az pozitif bir lenfosit (ok) ile sitoplazmasında diffüz pozitiviteye sahip bir monosit görülmekte (çift ok). ACP-az demonstrasyonu.X1152.



Şekil 44: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Hem korteks (K) ve hem de medullada (M) ACP-az pozitif lenfositlerin (oklar) yanında, sitoplazmalarında diffüz pozitiviteye sahip retikulum hücreleri ve makrofajlar görülmekte (ok başları). ACP-az demonstrasyonu.X230.



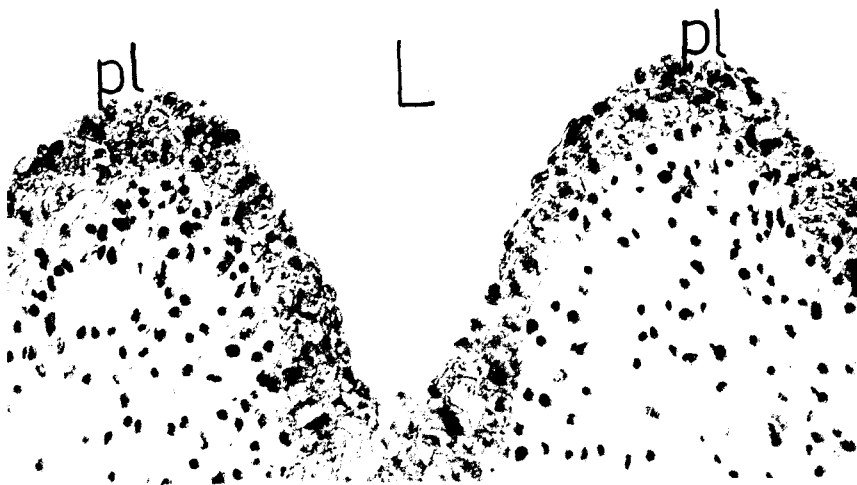
**Şekil 45:** Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivden alınan perifer kanda BG-az negatif lenfositler (oklar) ile sitoplazmasında diffüz pozitivite gösteren bir monosit (m) görülmekte. BG-az demonstrasyonu, X1440.



**Şekil 46:** Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin timus lobundan alınan kriyostat kesiti. Az sayıda BG-az pozitif lenfosit (oklar) ile sitoplazmalarında diffüz pozitiviteye sahip makrofaj ve retikulum hücreleri (ok başları) görülmekte. K=Korteks, M=Medulla. BG-az demonstrasyonu, X230.



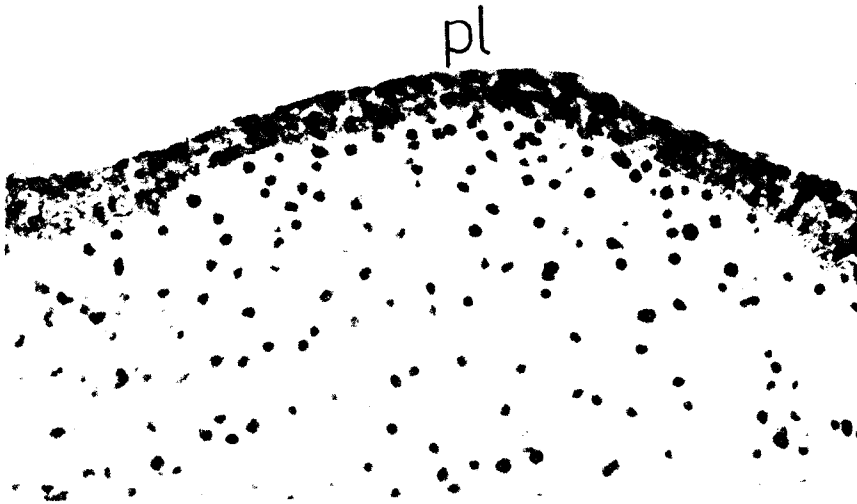
Şekil 47: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın yedinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Merkezi bir lümen (L) sahip olan organ taslağında, lümenin içini döşeyen epitelin bazal membranına yakın bölgelerde iri-bazofilik hücreler (oklar) ile yer yer mitotik figürler (m) görülmekte. Üçlü boyama, X460.



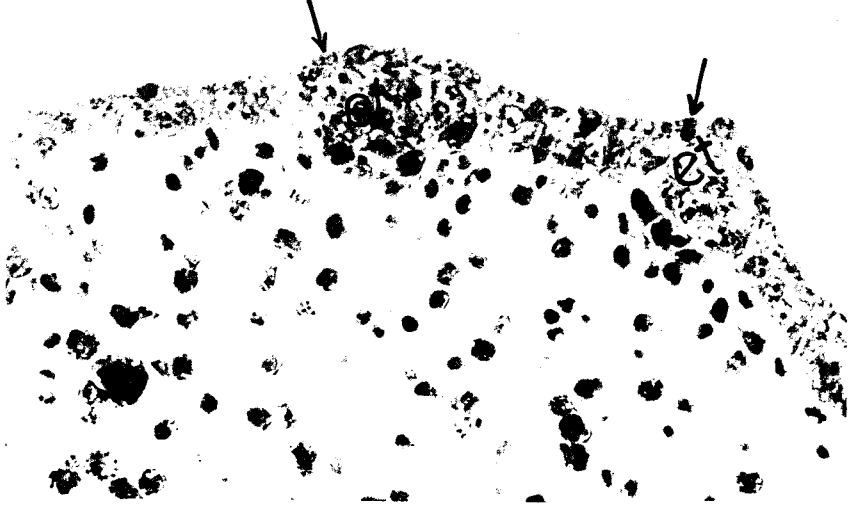
Şekil 48: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onuncu günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Lümen (L) doğru evagine olan epitel örtüsünün oluşturmuş oldukları plikalar (pl) görülmekte. Üçlü boyama, X589.



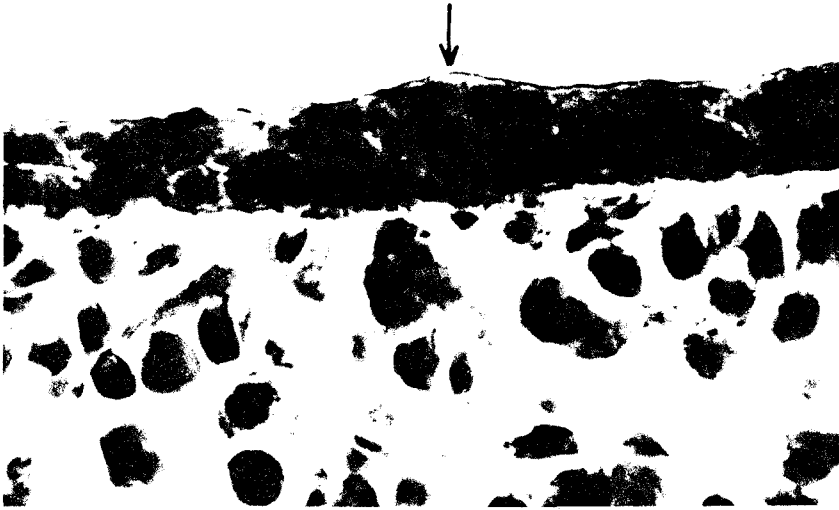
Şekil 49: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onuncu günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Epitel (E) altındaki mezenkimal alanlarda (mş) iri-bazofilik hücreler (oklar) görülmekte. Pappenheim'in panoptik boyası,X1152.



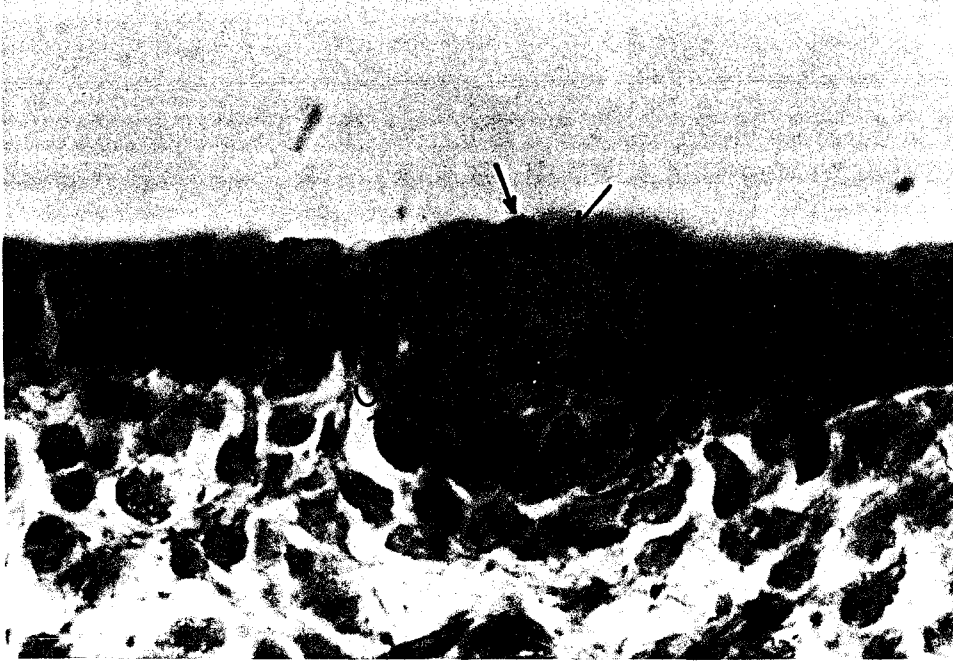
Şekil 50: 20 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onuncu günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Plika (pl) oluşumunun belirgin bir şekilde baskılandığı görülmekte. Üçlü boyama,X560.



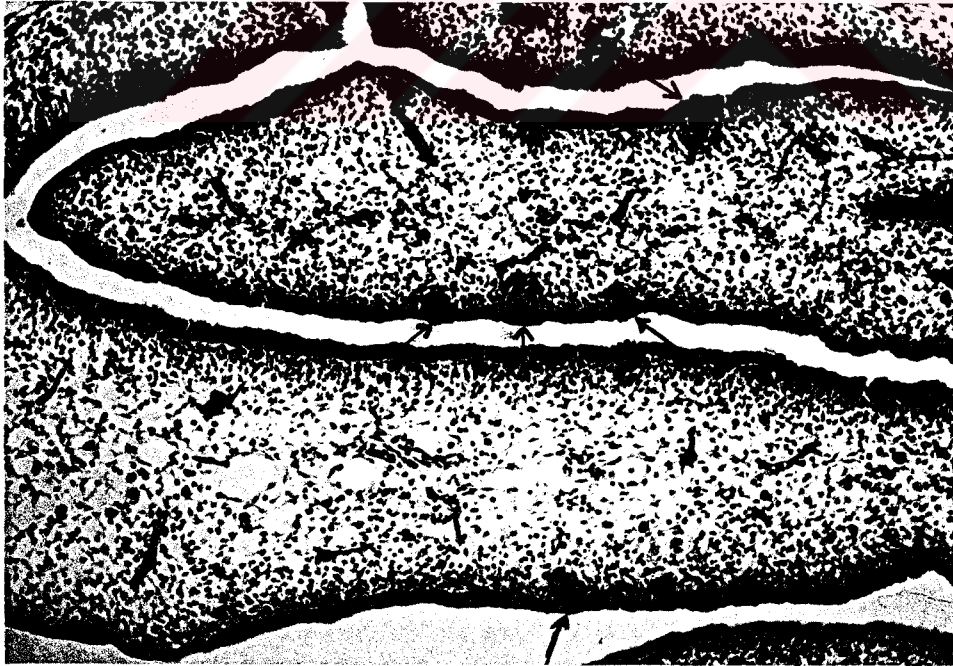
Şekil 51: Kontrol-2 grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Oluşumunu tamamlamış olan plikalarda iri-bazofilik hücrelerin oluşturdukları epitel tomurcukları gözlenirken (et), bu bölgenin üzerini örten epitel hücrelerinin yassılaştıkları görülmekte (oklar). Üçlü boyama, X640.



Şekil 52: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii taslağı. Epiteldeki tomurcuk oluşumunun (ok) baskılanmış olduğu dikkati çekmekte. Üçlü boyama, X720.



Şekil 53: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Yeni gelişmekte olan folikülün yan ve alt bölgelerinden subnodüler epitel (sne) adı verilen yassı hücrelerce çevrelendiği gözlenirken, bazofilik hücre topluluğunun içerisinde lenfosit morfolojisine sahip hücreler (oklar) görülmekte. Pappenheim'in panoptik boyası,X1440.

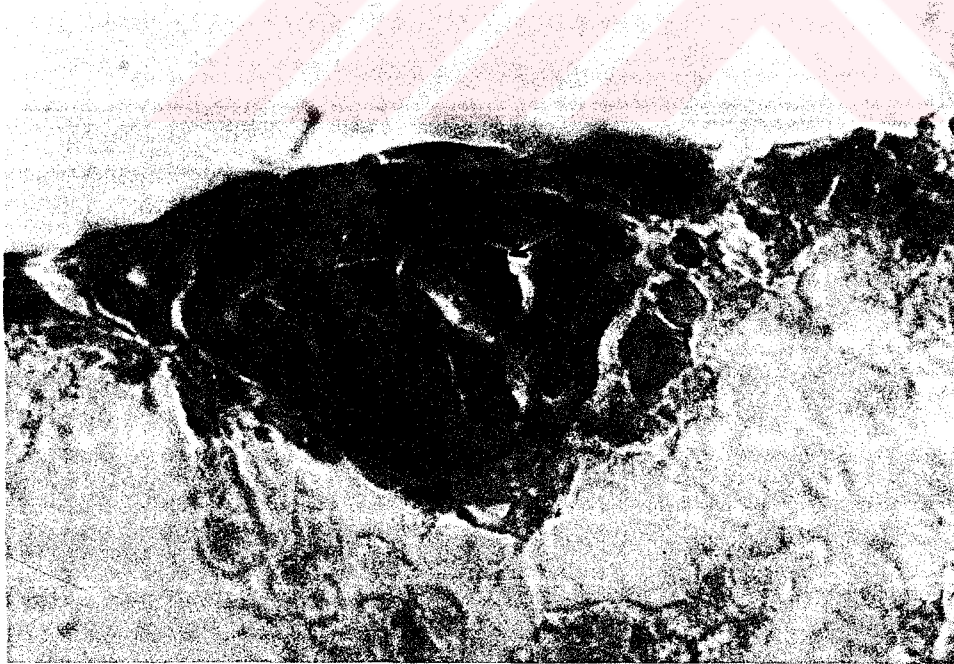


Şekil 54: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Epitel tomurcuklarının büyüyerek folikül halini almaya başladıkları görülmekte (oklar). Üçlü boyama,X147.





Şekil 55: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Plikalar gelişmiş olmasına karşın folikül oluşumunun henüz başlamadığı dikkati çekmekte. Üçlü boyama.X147.



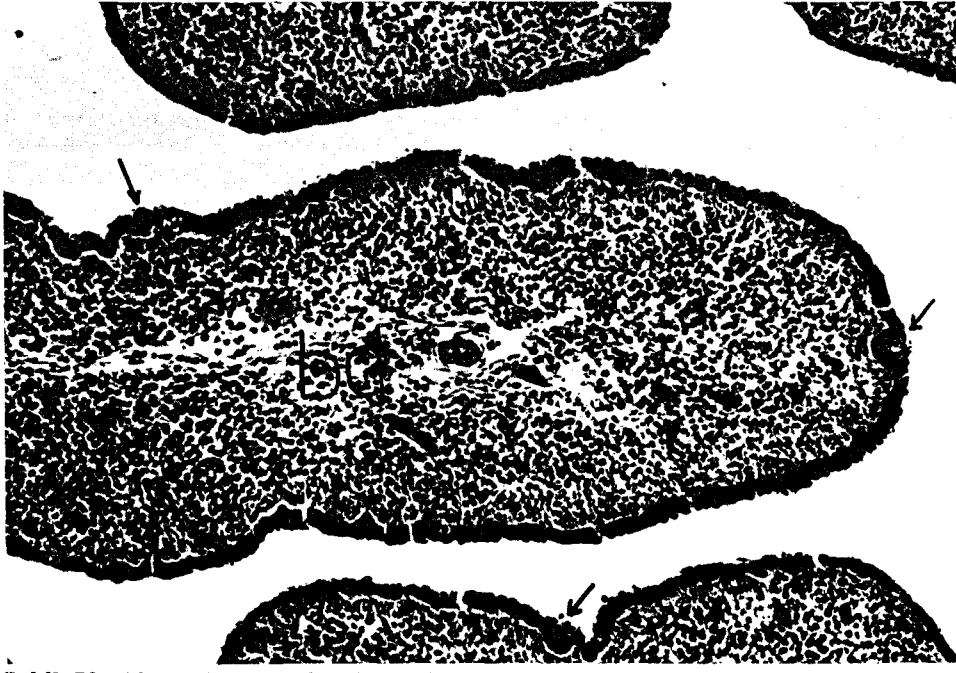
Şekil 56: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyonun bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Yeni gelişmekte olan lenfoid folikülün merkezi bölgesinde lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif bir hücre görülmekte (ok). ACP-az demonstrasyonu,X1440.



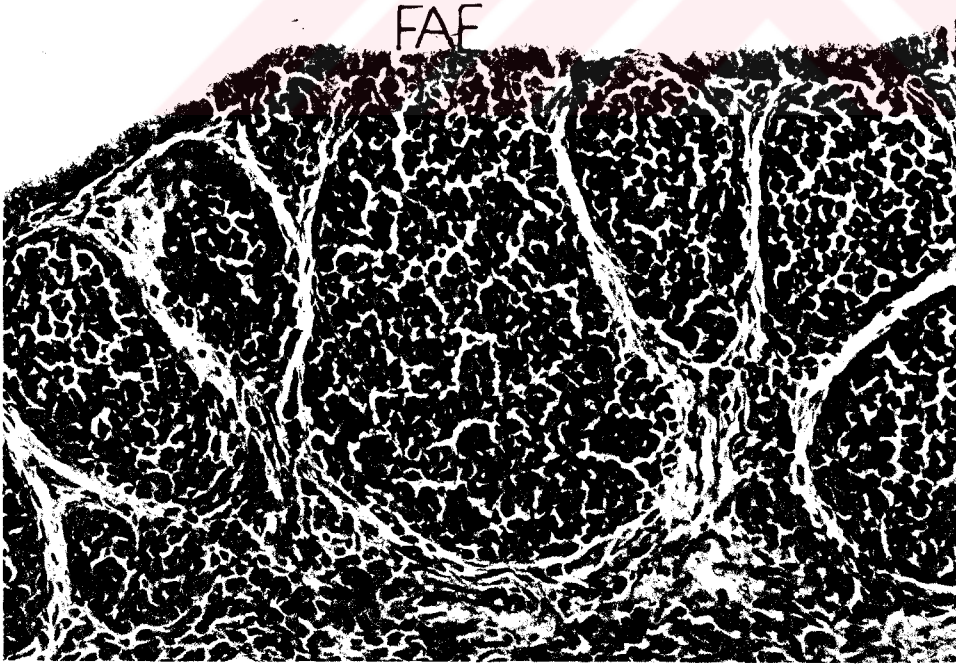
Şekil 57: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Epitel tomurcuklarının lenf folikülleri yönünde organize oldukları ve irileştikleri gözlenirken, gelişimi daha iyi olan birkaç folikülün (oklar) orta bölgelerinin daha soluk boyandığı ve yavaş yavaş medulla bölgesinin genel histolojik yapı özelliklerini kazanmaya başladıkları görülmekte. Üçlü boyama,X184.



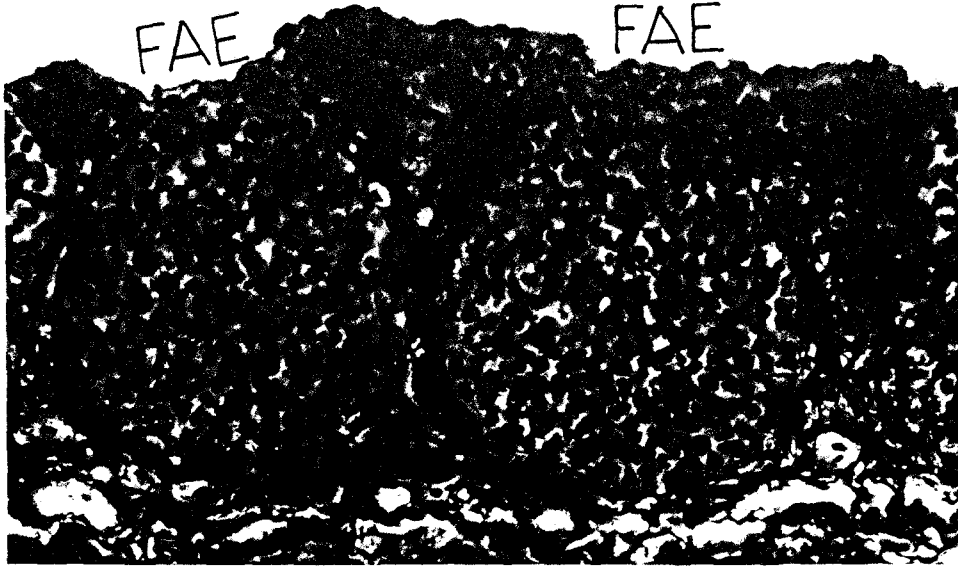
Şekil 58: Kontrol-2 grubuna ait kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyodan alınan bursa Fabricii kesiti. Gelişmekte olan folikülün retikulum iplikleri ağı ile kuşatıldığı ve İFE'yi oluşturacak olan epitelin üzerine oturduğu bazal membranın subnodüler epitelin (sne) bazal membranı ile bağlantılı olduğu gözlenirken (oklar), FAE epitelinin bazal membrana sahip olmadığı görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası,X1152.



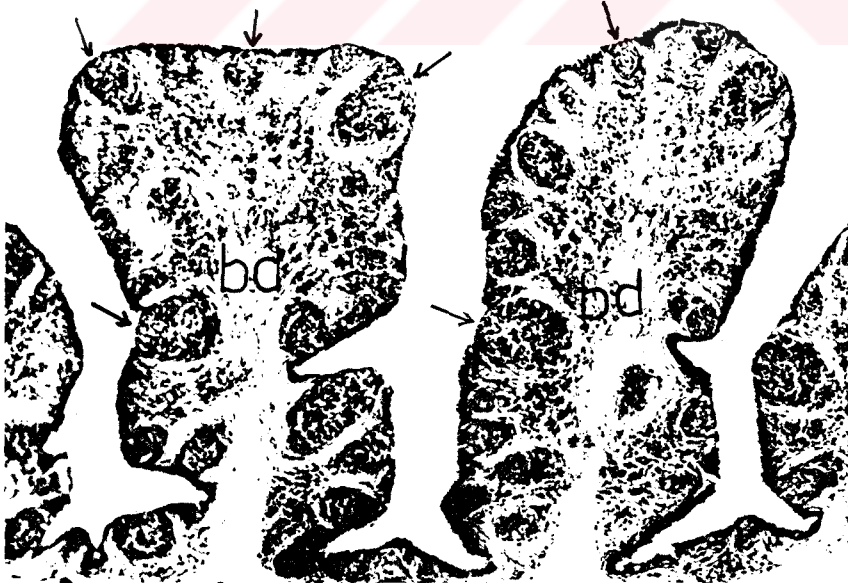
Şekil 59: 10 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onbeşinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Folikül gelişiminin baskılandığı, gelişen birkaç adet folikülün ise henüz epitel tomurcuğu aşamasında oldukları gözlenirken (oklar), bağ doku (bd) alanlarındaki yoğun cozinofilik hücre infiltrasyonu dikkati çekmekte. Üçlü boyama.X184.



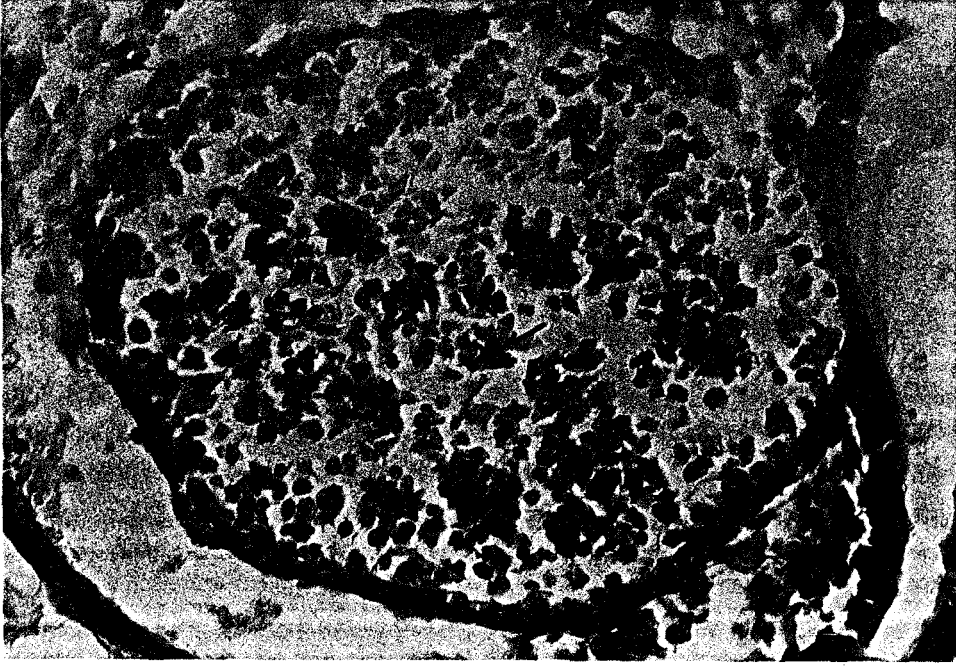
Şekil 60: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun bursa Fabricii kesiti. Foliküllerin gelişimlerini büyük ölçüde tamamlayıp organın lamina propriyasını doldurdukları gözlenirken, subnodüler epitelin (oklar) dışında birkaç sıra lenfositlerden oluşan korteks (k) görülmekte. Üçlü boyama,X322.



Resim 61: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Folikül ilişkili epitelin (FAE) altında bazal membranın olmadığı görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası.X576.



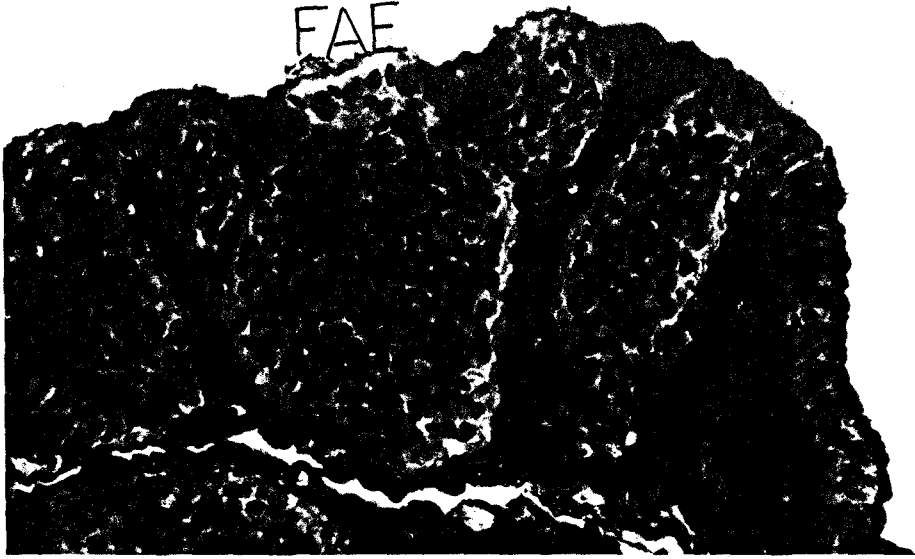
Şekil 62: 10 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait bursa Fabricii kesiti. Foliküllerdeki gelişme geriliğine bağlı olarak bağ doku alanlarının (bd) fazla olduğu gözlenirken, folikül ilişkili epitelin gelişmesini tamamlamadığı görülmekte (oklar). Üçlü boyama.X138.



Şekil 63: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Folikülün medulla bölgesinde ANAE pozitif lenfositler (oklar) görülmekte. ANAE demonstrasyonu, X461.



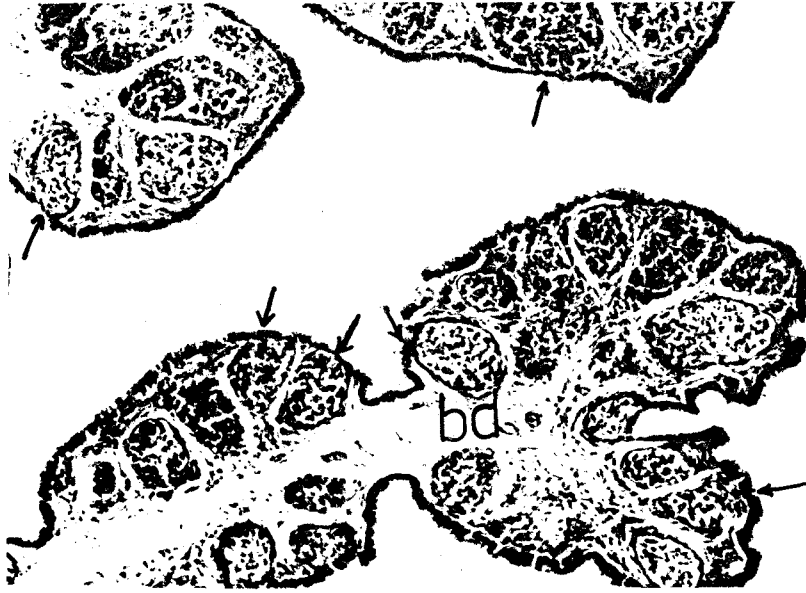
Şekil 64: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivden alınan bursa Fabricii kesiti. Folikül gelişiminin tamamlanmış olduğu ve gelişen foliküllerin plikayı tamamen doldurduğu görülmekte. Üçlü boyama, X147.



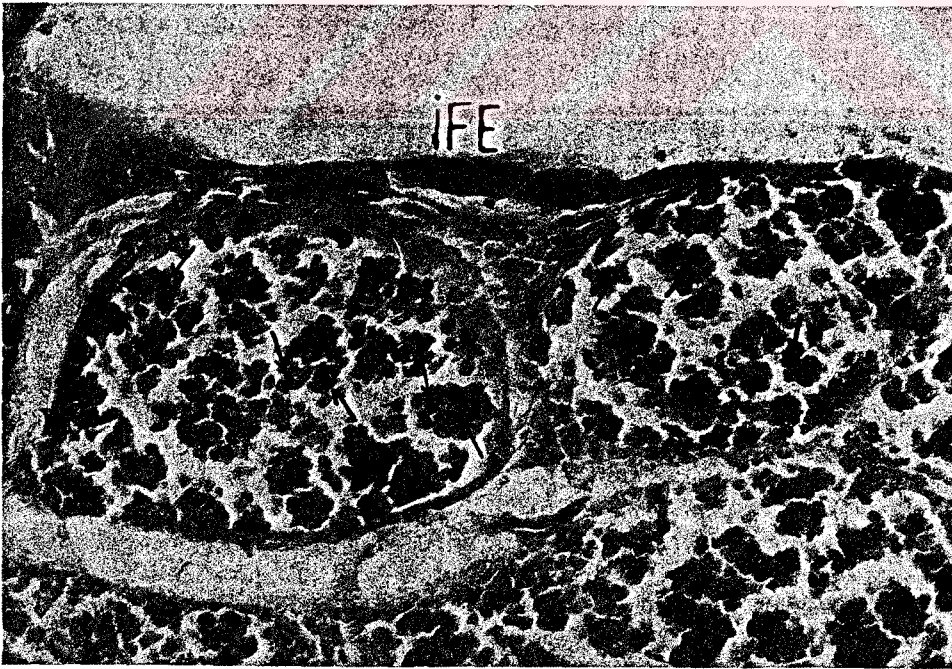
Şekil 65: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivden alınan bursa Fabricii kesiti. Oldukça iyi gelişen FAE'nin bazal membrandan yoksun olduğu ve folikülün medullası (M) ile bir bütün oluşturduğu görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası. X576.



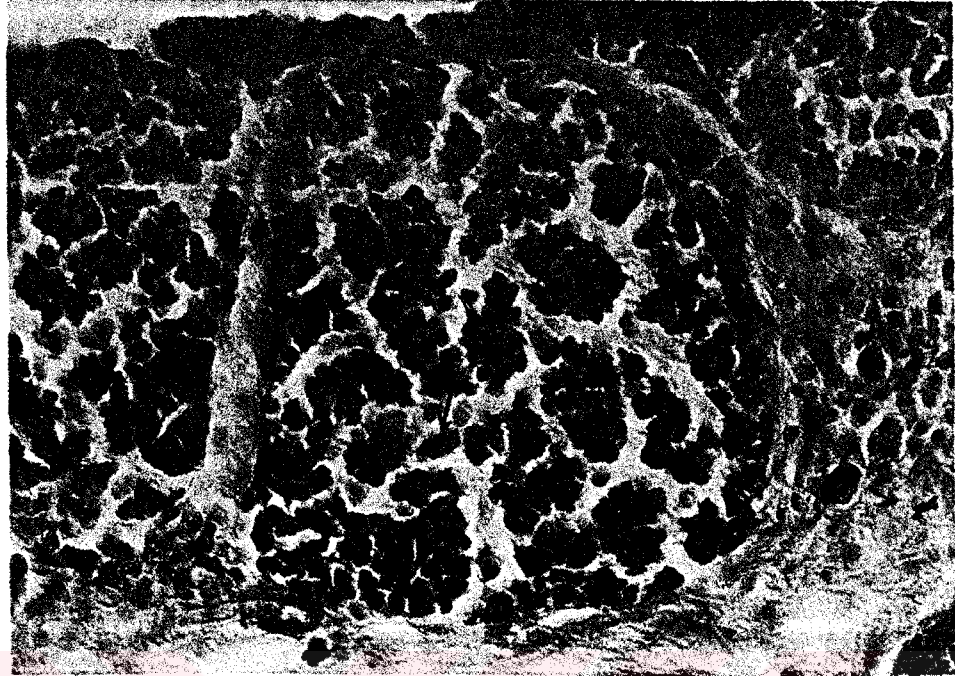
Şekil 66: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivden alınan bursa Fabricii kesiti. Medulla bölgesinde piknotik çekirdekli lenfositler ile bunların yıkımlanması sonucunda oluşan granüler hücre artıklarını fagosite etmiş iri makrofajlar görülmekte (oklar). Üçlü boyama. X1440.



Şekil 67: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 10 ng AFB<sub>1</sub> grubundan bir civcive ait bursa Fabricii kesiti. Foliküllerin tam olarak gelişmemesine bağlı olarak bağ dokuda (bd) yer yer boş alanlar kaldığı ve folikül ilişkili epitelin (oklar) klasik yapısını kazanamadığı görülmekte. Üçlü boyama.X147.



Şekil 68: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Folikülün medulla bölgesindeki lenfositlerin bazıları (oklar) ile İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının ACP-az pozitifitesine sahip olduğu görülmekte. ACP-az demonstrasyonu,X317.

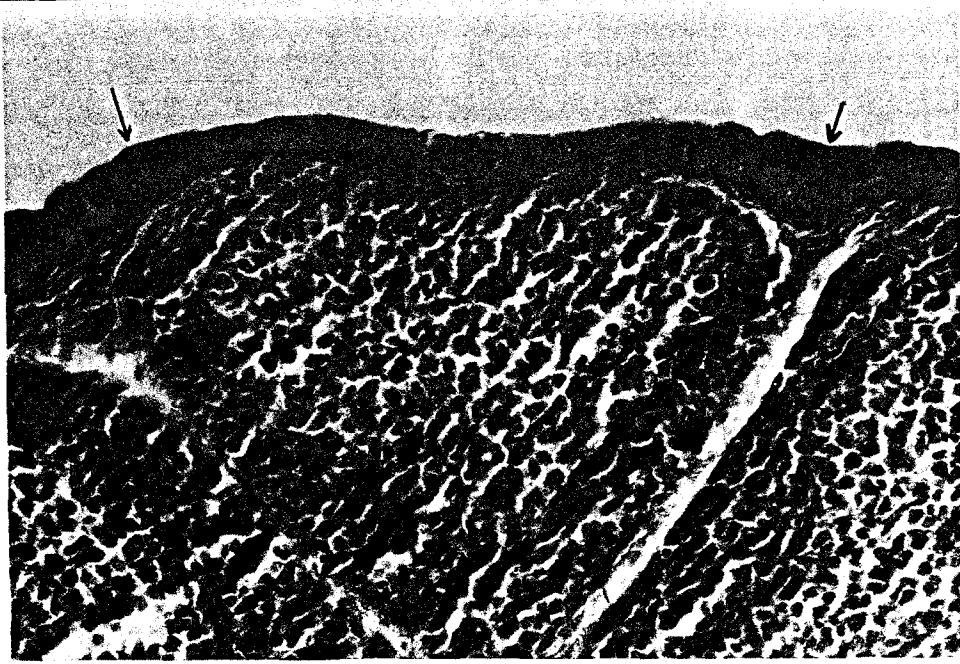


Şekil 69: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Folikülün medulla bölgesinde birkaç adet BG-az pozitif lenfosit (oklar) görülmekte. BG-az demonstrasyonu, X461.



Şekil 70: Kontrol-1 grubundan dört haftalık bir civcive ait bursa Fabricii kesiti. Bütüyen ve organın submukozasını tamamen dolduran foliküllerin koyu boyanan korteks bölgelerinin genişlemiş olduğu görülmekte. Üçlü boyama, X184.

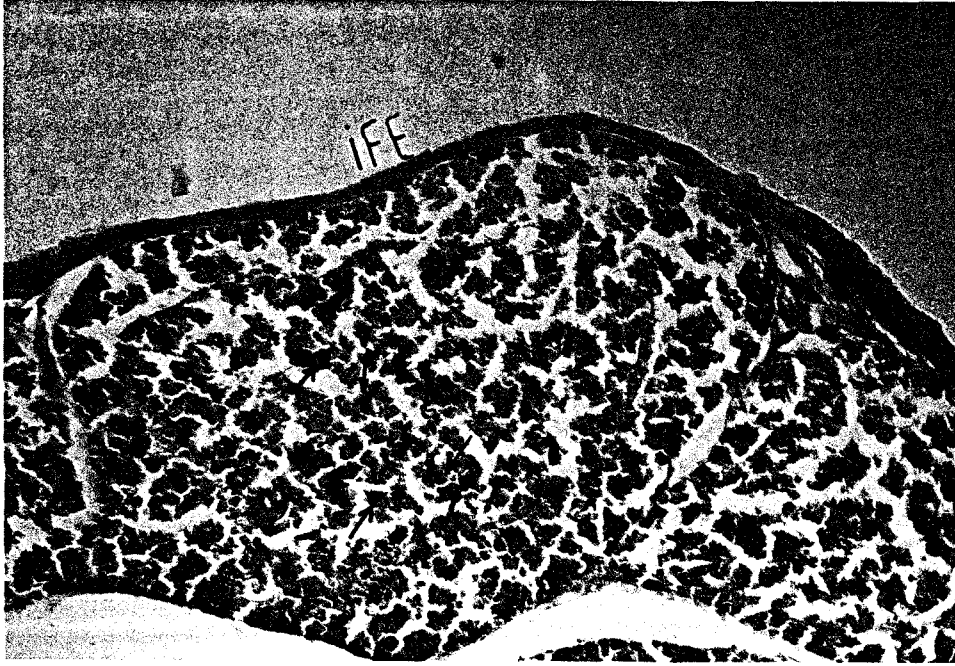




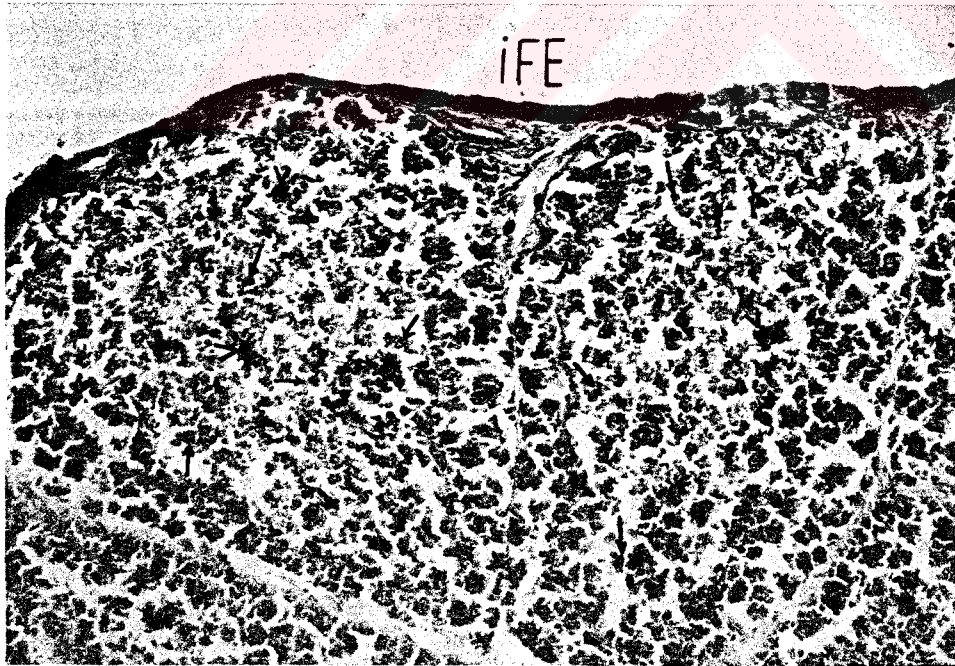
Şekil 71: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin bursa Fabricii kesiti. İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının (oklar) PAS pozitif reaksiyon verdiği görülmekte (oklar). PAS.X460.



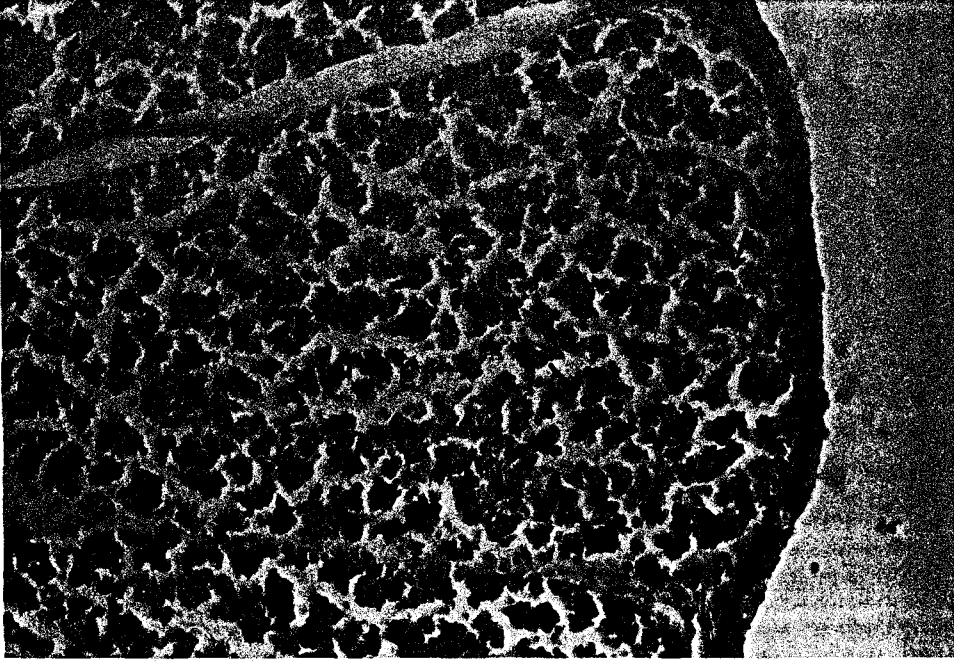
Şekil 72: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivden alınan bursa Fabricii kesiti. FAE'nin bazal membrandan yoksun olduğu görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası.X1152.



Şekil 73: Kontrol-2 grubuna ait dört haftalık bir civcivin bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Folikülün medulla bölgesindeki bazı lenfositler ile (oklar) İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin ANAE pozitivitesine sahip olduğu görülmekte. ANAE demonstrasyonu.X230.



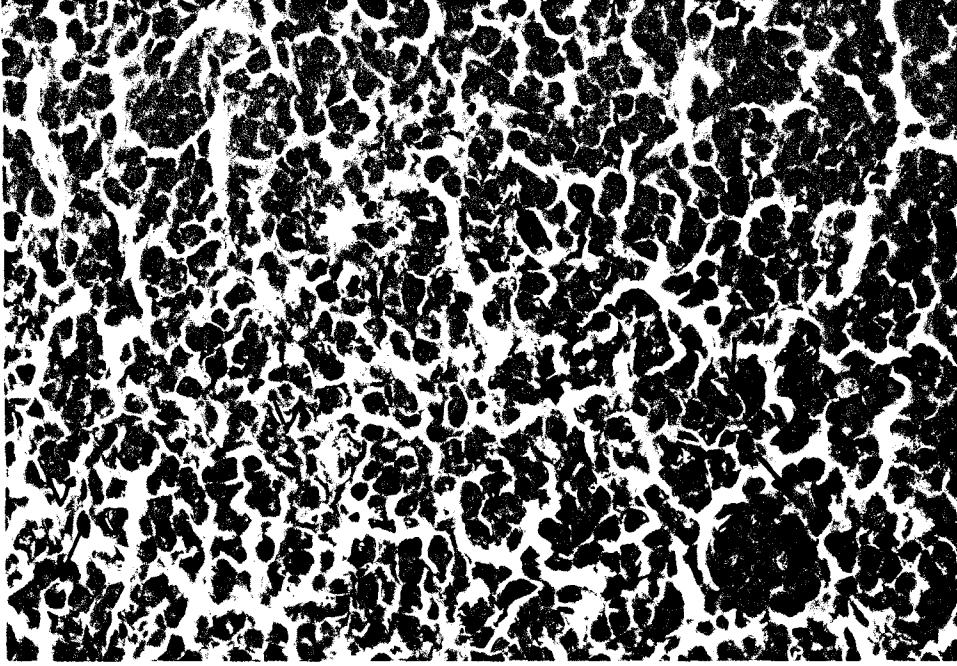
Şekil 74: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin bursa Fabricii'sinden alınan kriyostat kesiti. Folikülün medullasında yer alan bazı lenfositler ile (oklar) makrofaj ve retikulum hücrelerinin (ok başları) yanında İFE'yi oluşturan epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının da ACP-az pozitivitesine sahip oldukları görülmekte. ACP-az demonstrasyonu.X184.



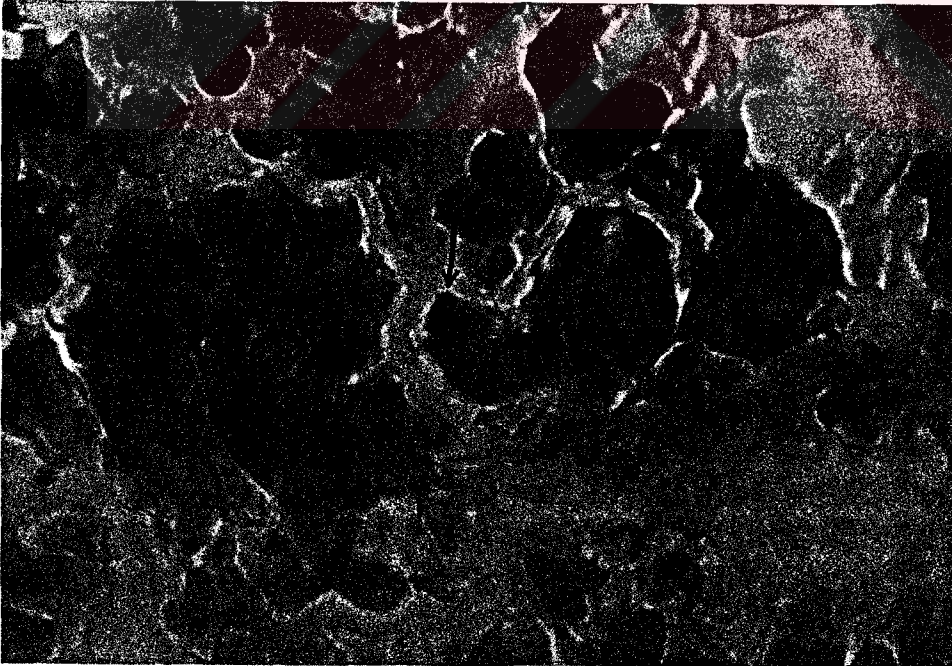
Şekil 75: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin bursa Fabricii'nden alınan kriyostat kesiti. Lenf folikülünün medulla bölgesindeki az sayıdaki lenfositin (oklar) BG-az pozitif oldukları görülmekte. BG-az demonstrasyonu.X230.



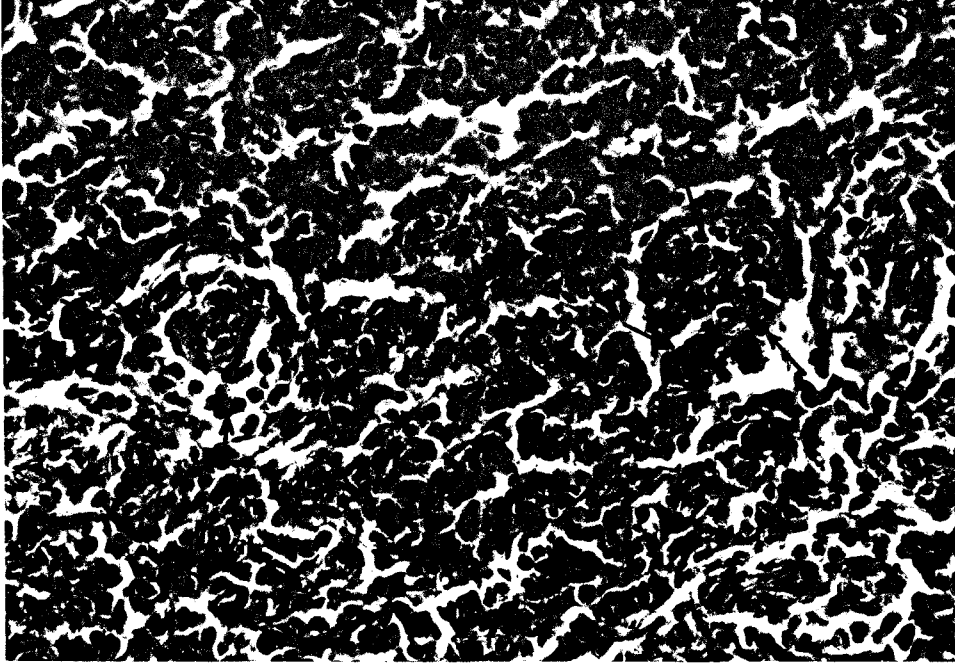
Şekil 76: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Küçük çaplı damarların (oklar) adventisya katmanlarına infiltrate olan az sayıdaki lenfosit (çift oklar) ile gelişmekte venöz damar ağı (v) görülmekte. Üçlü boyama.X576.



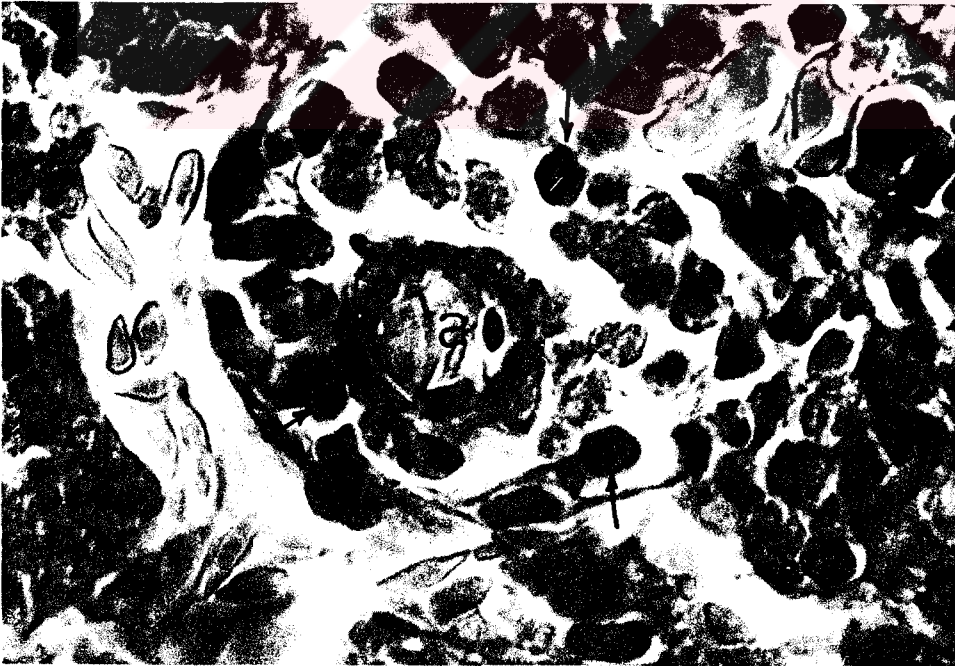
Şekil 77: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Küçük çaplı damarların (oklar) adventisya katmanına infiltre olan lenfositlerin daha az olduğu ve venöz damar ağı (v) gelişiminin de geri kaldığı görülmekte. Üçlü boyama.X576.



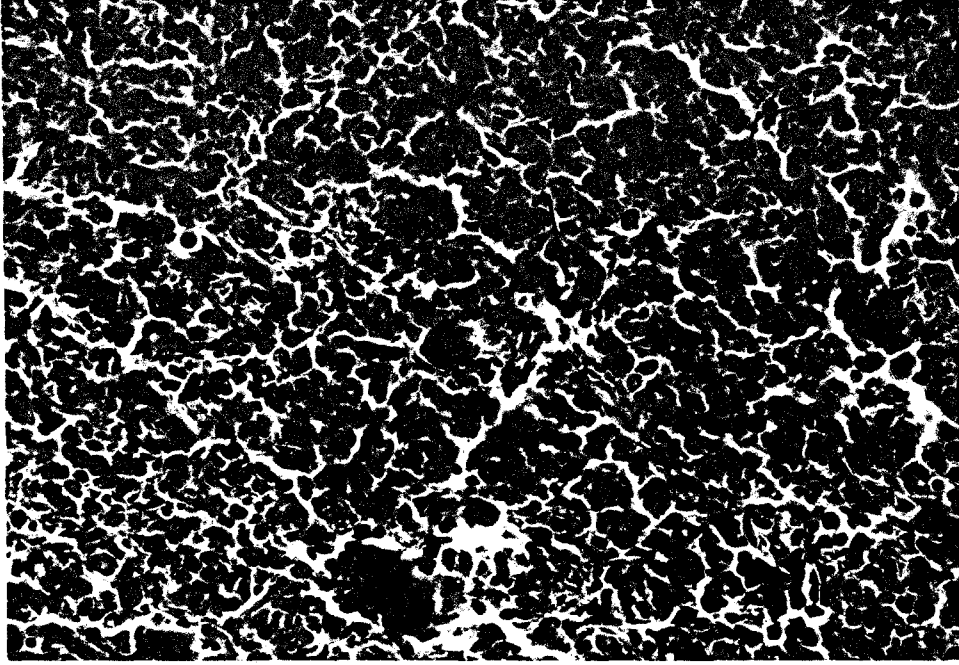
Şekil 78: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onikinci günündeki bir embriyonun dalağından alınan kriyostat kesiti. Lenfosit morfolojisine sahip ACP-az pozitif bir hücre (ok) görülmekte. ACP-az demonstrasyonu,X1440.



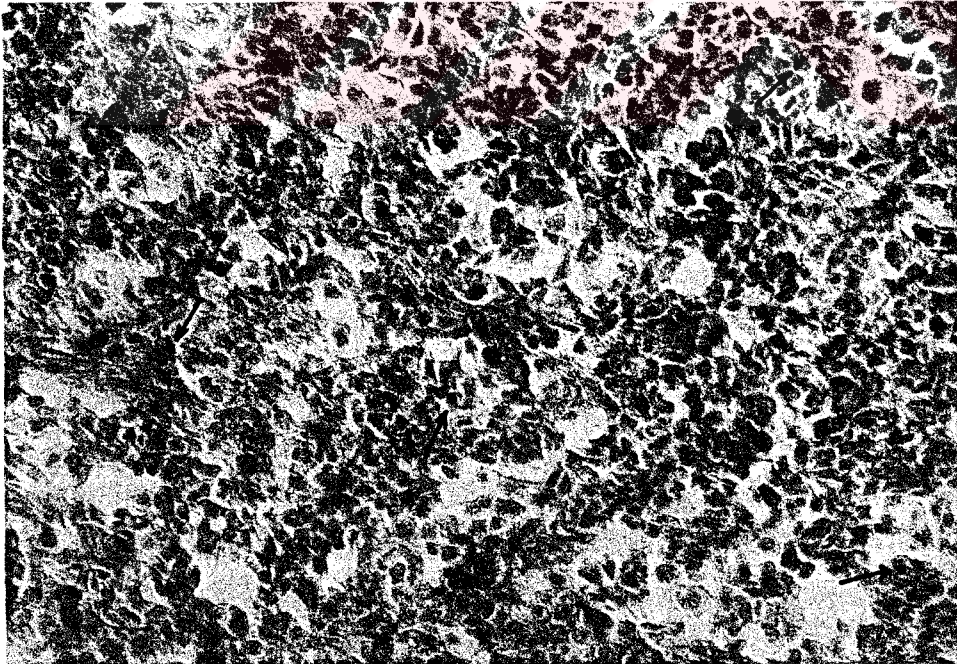
Şekil 79: Kontrol-I grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Arterlerin (a) tunika adventisyasındaki yoğun lenfoid hücre (oklar) infiltrasyonunun artması ile birlikte dalağa özgü foliküllerin biraz daha geliştiği görülmekte. Üçlü boyama.X460.



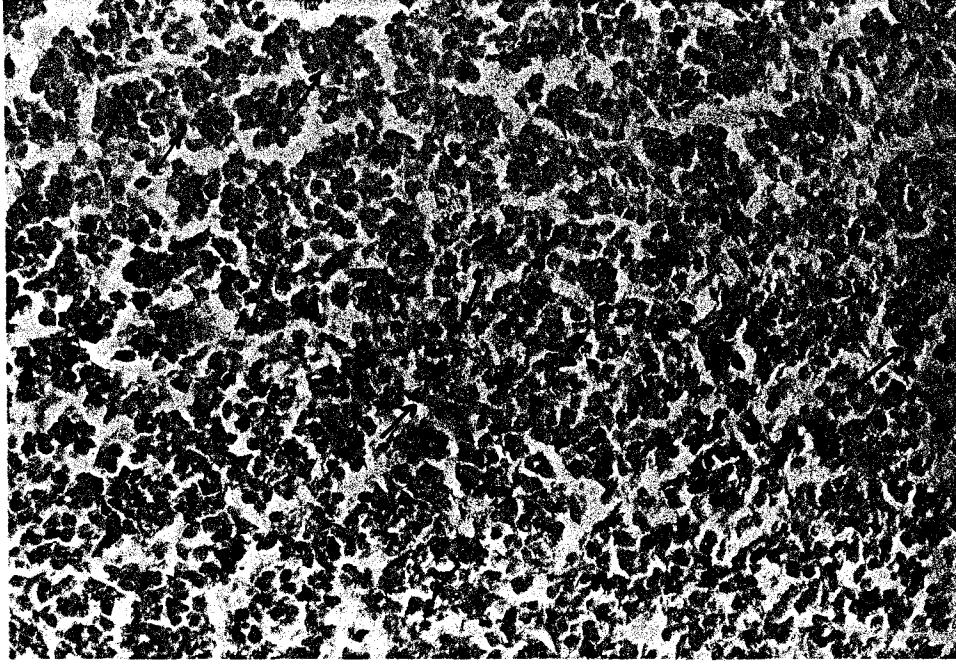
Şekil 80: Kontrol-I grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Bir arter (a)'in adventisya tabakasına infiltre olan lenfoid hücreler (oklar) görülmekte. Pappenheim'in panoptik boyaması,X1440.



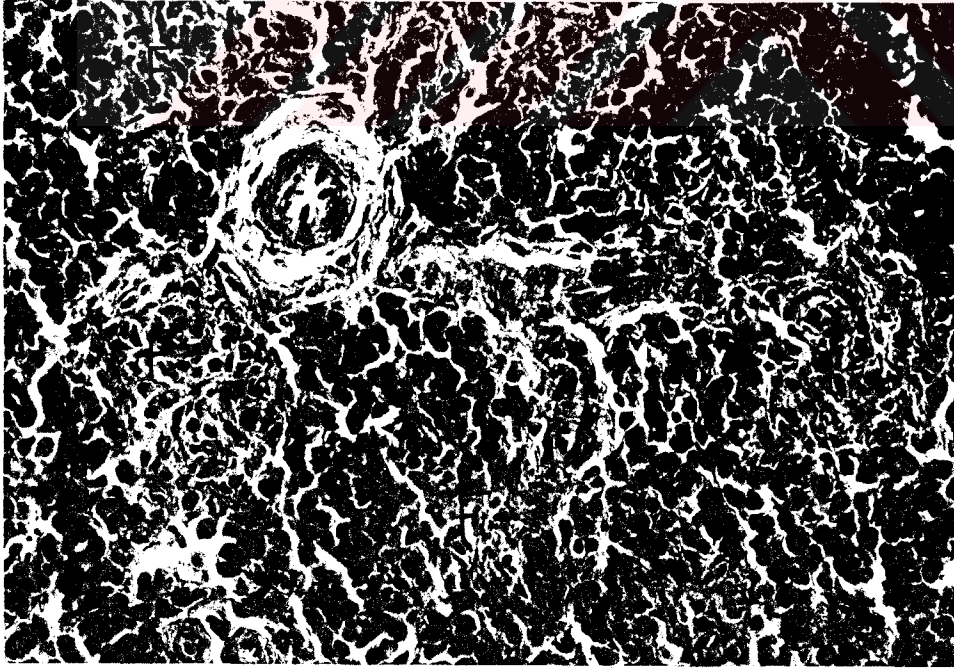
Şekil 81: 40 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Küçük çaplı damarların (oklar) adventisya tabakalarındaki lenfoid hücre infiltrasyonunun daha az olmasına bağlı olarak folikül gelişiminin geri kaldığı görülmekte. Üçlü boyama, X370.



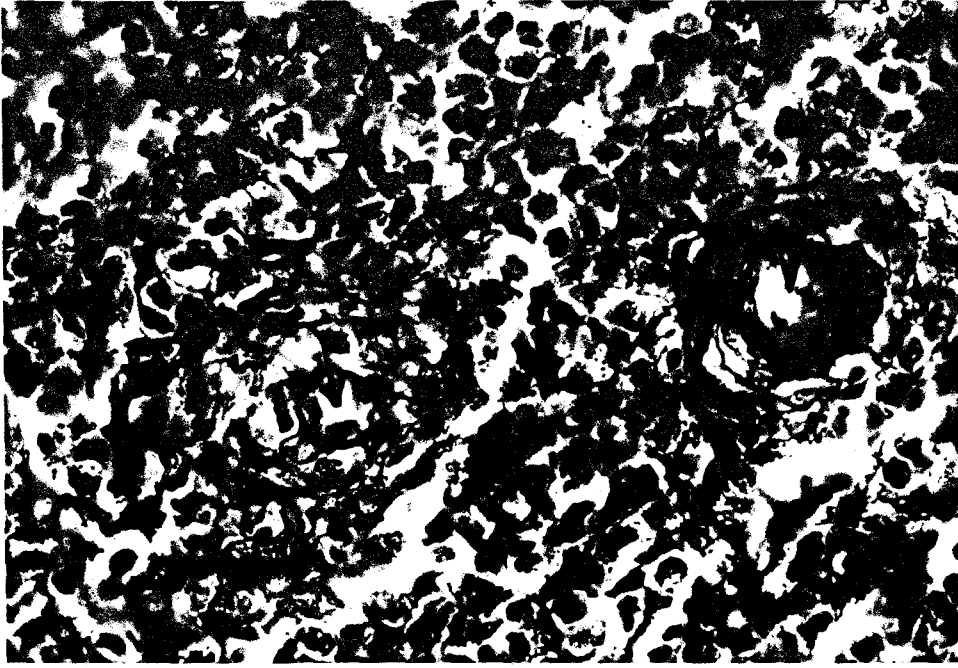
Şekil 82: Kontrol-İgrubuna ait kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyonun dalağından alınan bir kriyostat kesiti. Az sayıda ACP-az pozitif lenfoid hücreler görülmekte (oklar). ACP-az demonstrasyonu, X460.



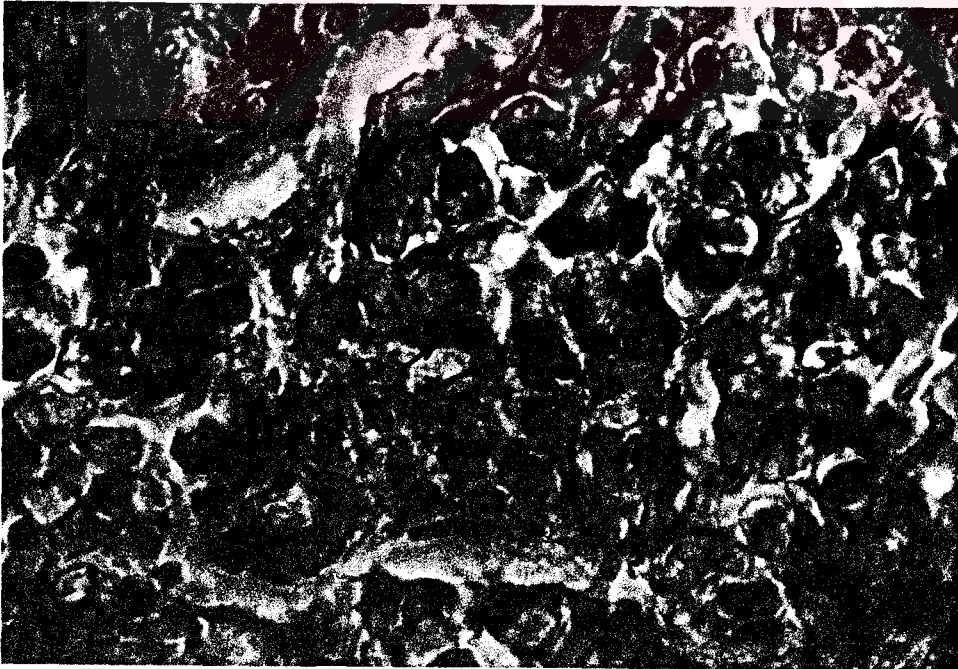
Şekil 83: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onüçüncü günündeki bir embriyonun dalağından alınan kriyostat kesiti. Lenfosit morfolojisine sahip çok sayıda BG-az pozitif hücre görülmekte (oklar). BG-az demonstrasyonu.X288.



Şekil 84: Kontrol-1 grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Lenf foliküllerinin (F) histolojik organizasyonunun biraz daha ilerlemiş olduğu görülmekte. Üçlü boyama.X460.

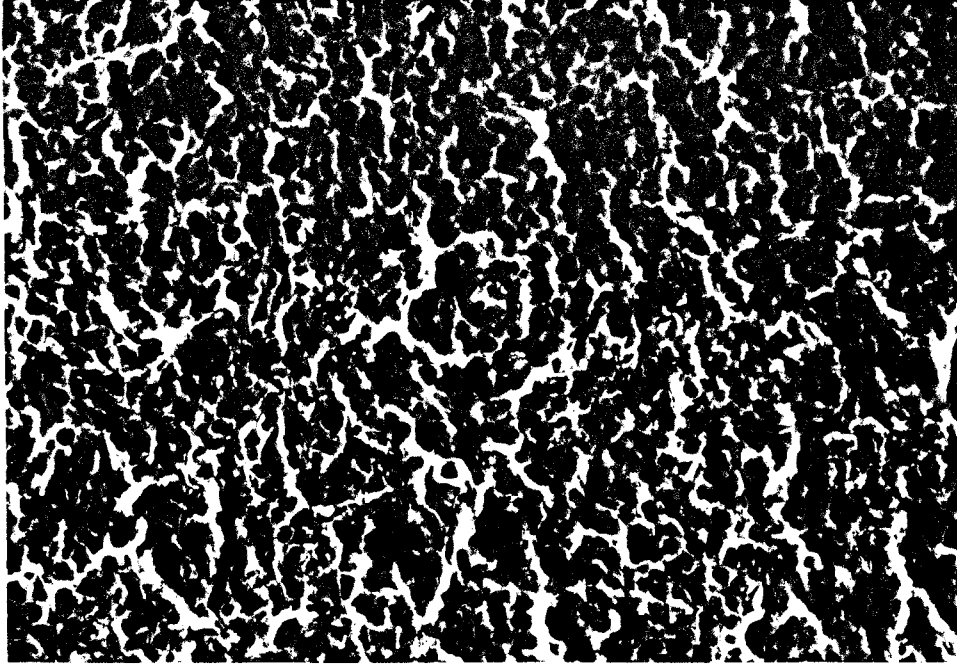


**Şekil 85:** Kontrol-2 grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. A.trabekülaris (ok-sağda) ve a.centralis (ok-solda)'in tunika adventisyalardaki retiküler iplik ağı görülmekte. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası.X921.

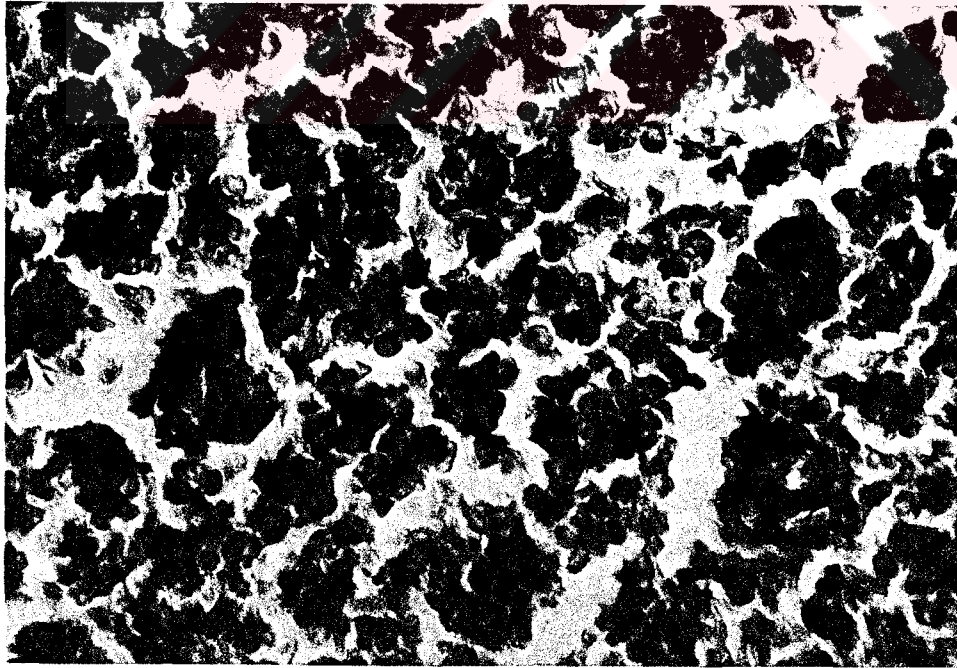


**Resim 86:** Çözücü (%30 ETOH) grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Plazma hücrelerine benzer morfolojiye sahip iri-pironinofilik sitoplazmalı hücreler (oklar) görülmekte. MGP,X1440.

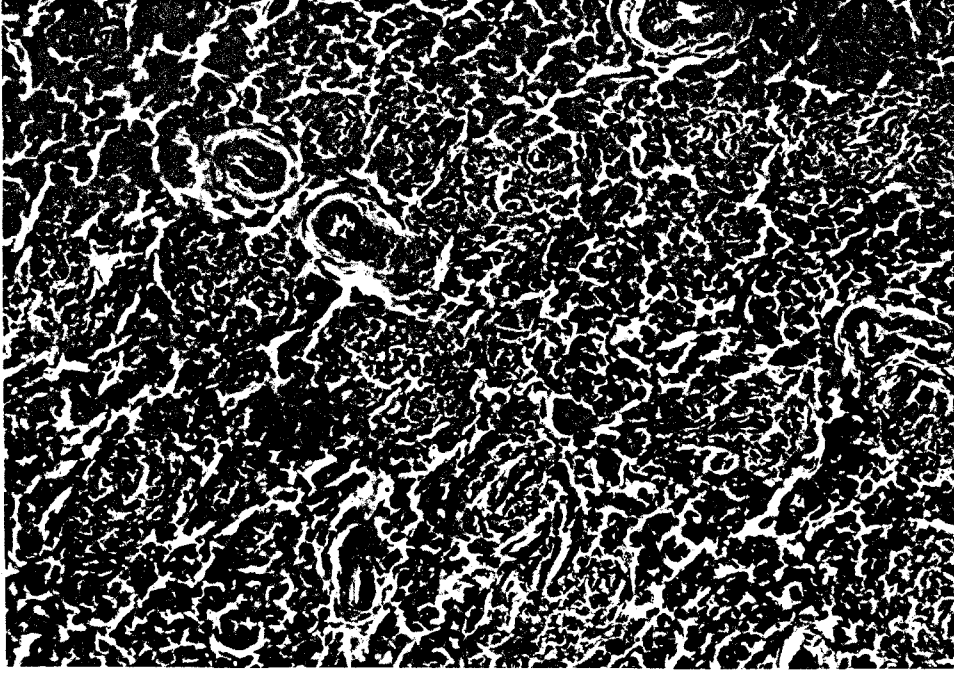




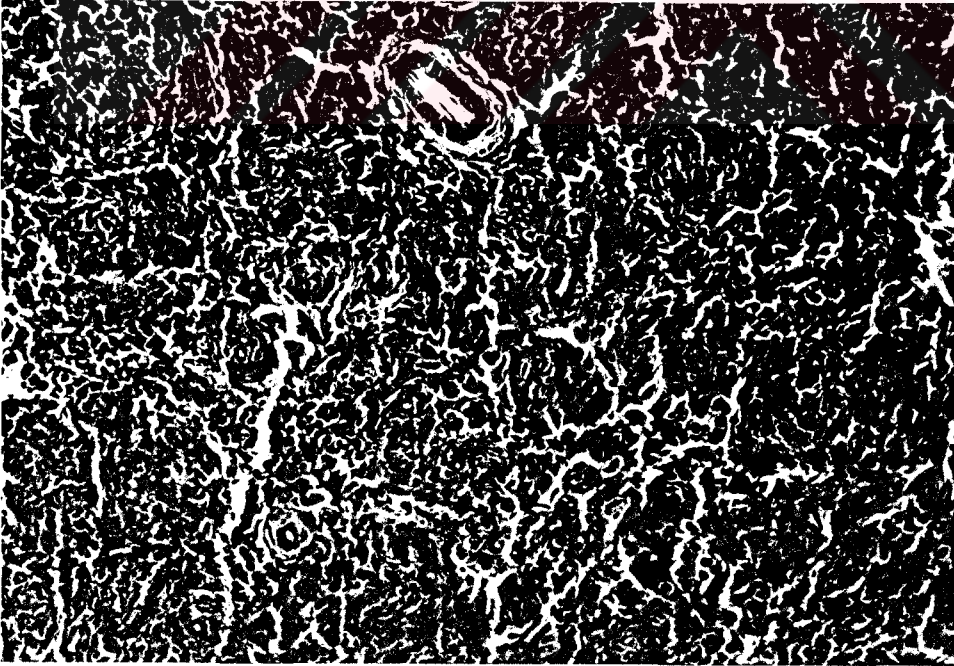
Şekil 87: 10 ng AFB<sub>1</sub> grubundan kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyoya ait dalak kesiti. Lenf folikülü (f) gelişiminin belirgin bir şekilde baskılanmış olduğu görülmekte. Üçlü boyama.X460.



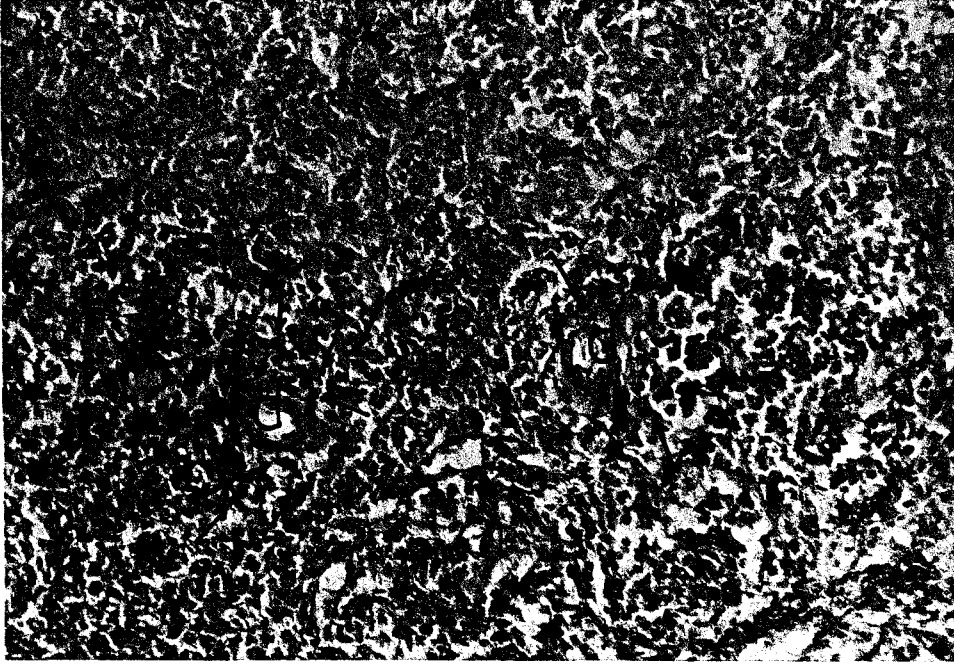
Şekil 88: Kontrol-1 grubuna ait kuluçkanın onsekizinci günündeki bir embriyonun dalağundan alınan kriyostat kesiti. ANAE pozitif bir lenfosit görülmekte (ok). ANAE demonstrasyonu.X576.



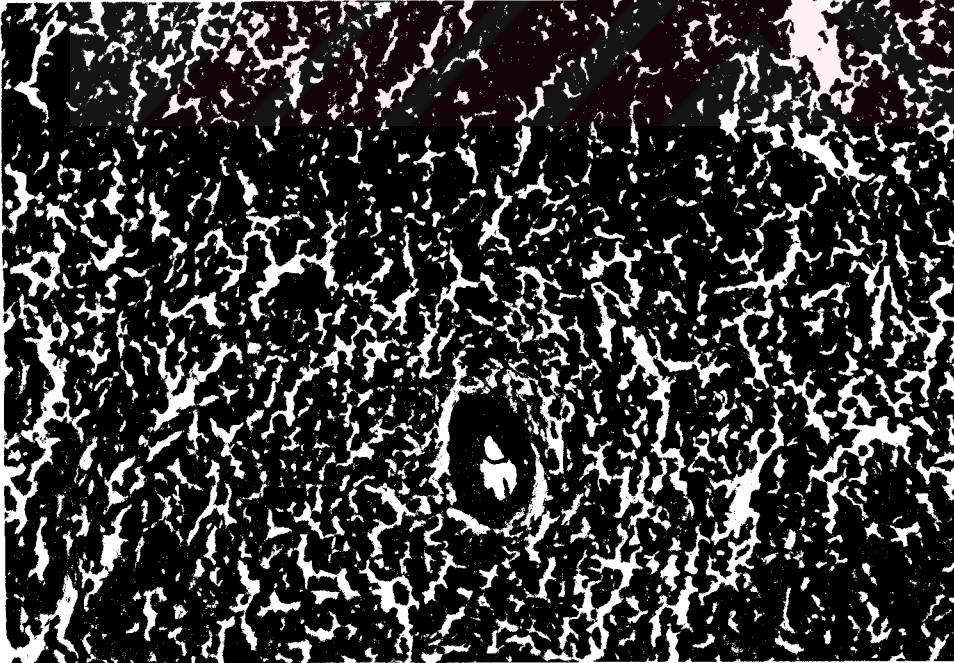
Şekil 89: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubundan bir civcive ait dalak kesiti. Histolojik organizasyonun hemen hemen tamamlanmış olduğu ve lenf foliküllerinin (f) merkezi bölgelerinin biraz daha soluk boyandığı görülmekte. Üçlü boyama, X230.



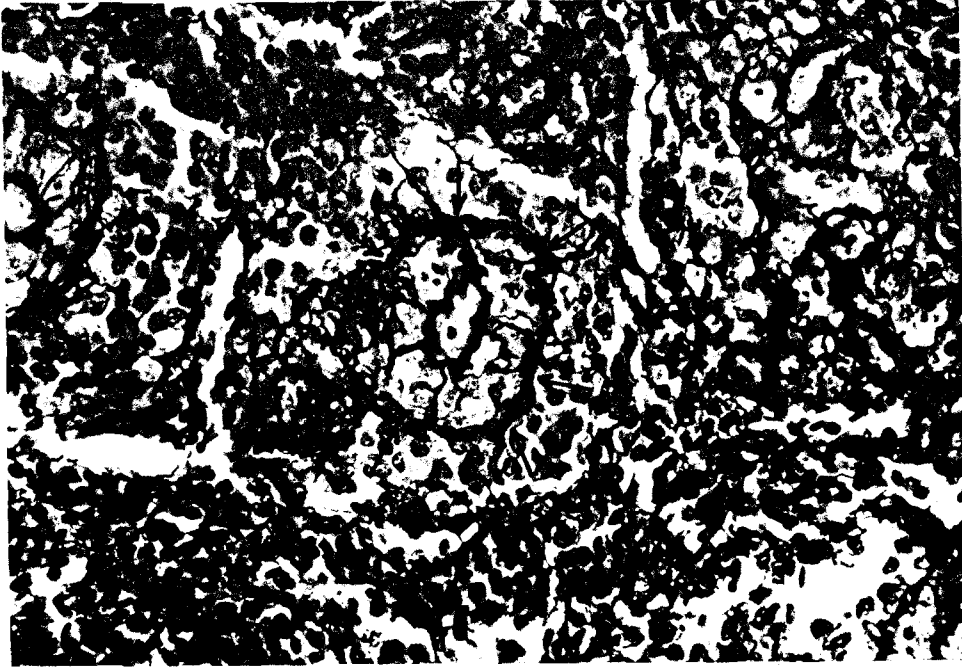
Şekil 90: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 5 ng AFB<sub>1</sub> grubundan bir civcive ait dalak kesiti. Lenf folikülü (f) gelişiminin belirgin bir şekilde baskılandığı ve foliküllerin merkezinde soluk boyanan bölgelerin bulunmadığı görülmekte. Üçlü boyama, X230.



Şekil 91: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol-1 grubuna ait bir civcivin dalağundan alınan kriyostat kesiti. ANAE pozitif lenfositlerin (oklar) arteriya sentralis (d)'ler etrafındaki lokalizasyonları görülmekte. ANAE demonstrasyonu.X230.



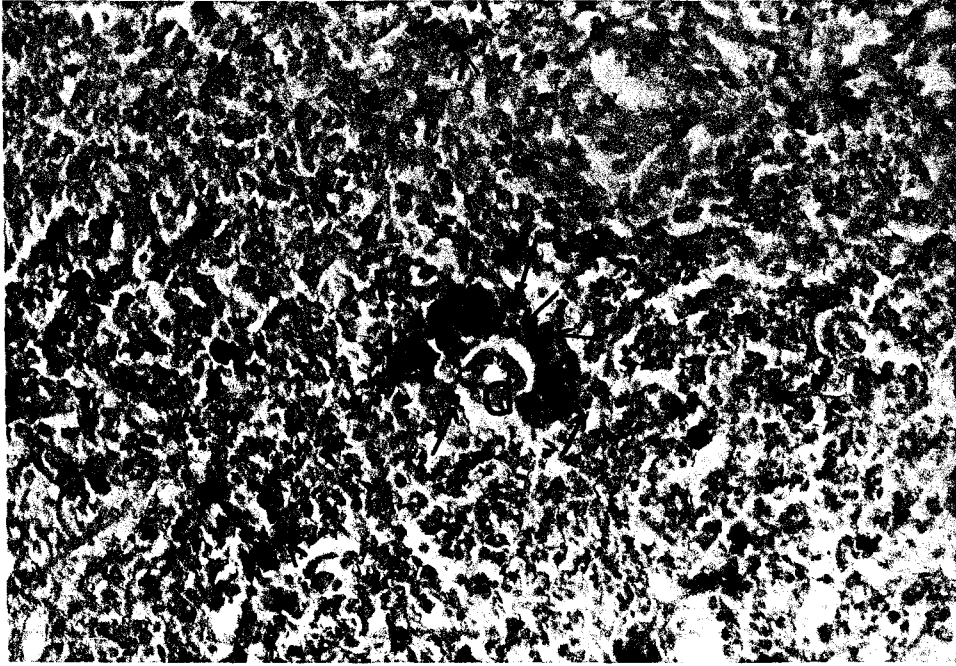
Şekil 92: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin dalağundan alınan bir kesit. Eksentrik yerleşimli arteriya sentralis'e (d) sahip olan gelişimini tamamlamış bir folikül (f) ile kan hücreleriyle dolu durumdaki venöz sinuslar (v) görülmekte. Üçlü boyama.X360.



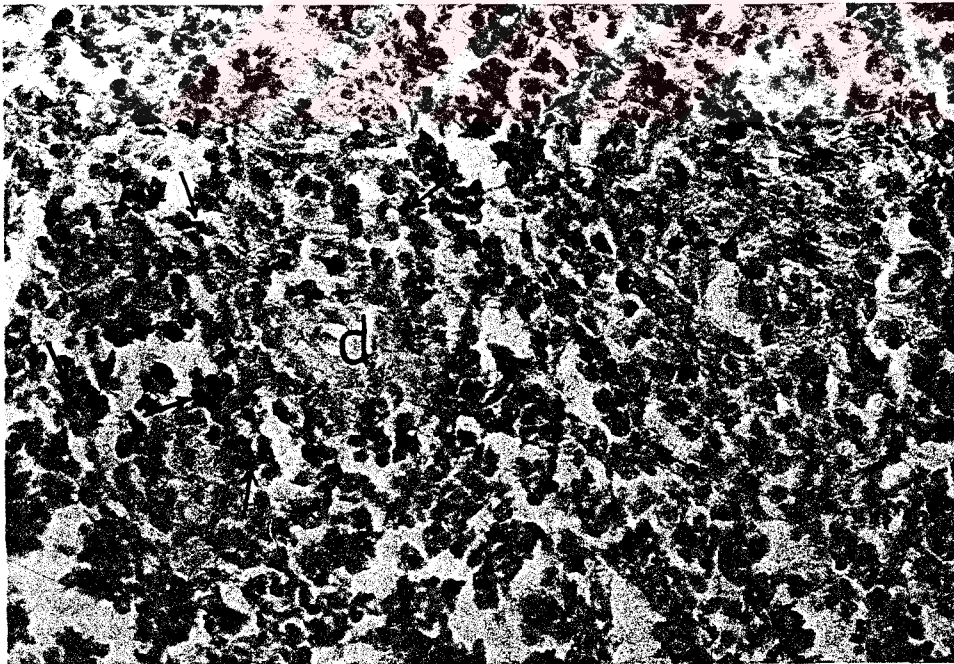
Şekil 93: Çözücü (%30 ETOH) grubundan dört haftalık bir civcive ait dalak kesiti. Foliküllerin çatısını oluşturan retikulum ipliklerinin, arteriya sentralis'in tunika adventisyasındaki ipliklerle devam ettiği görülmekte (oklar). Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası.X576.



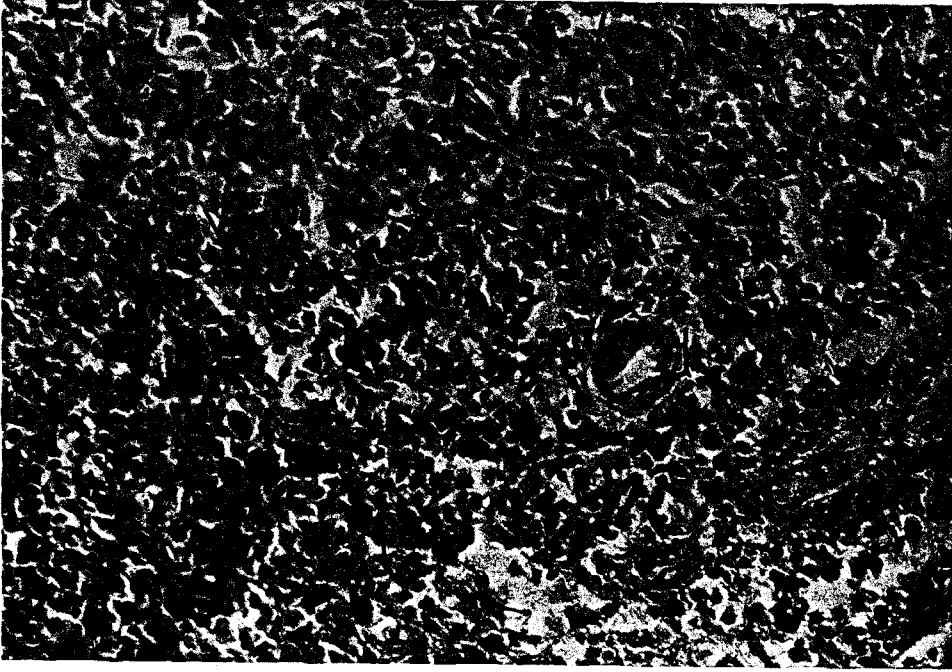
Şekil 94: Çözücü (%30 ETOH) grubuna ait dört haftalık bir civcivden alınan dalak kesitinde plazma hücreleri görülmekte (oklar) MGP,X1440.



Şekil 95: Kontrol-2 grubuna ait dört haftalık bir civcivin dalağında alınan kriyostat kesiti. ANAE pozitif lenfositlerin (oklar) arteriya sentralis (d) etrafındaki tipik yerleşimlerinin yanı sıra makrofaj ve retikulum hücrelerinin de diffüz tarzda ANAE pozitivitesine sahip oldukları görülmekte (ok başları). ANAE demonstrasyonu.X360.



Şekil 96: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin dalağında alınan kriyostat kesiti. ACP-az pozitif lenfositlerin (oklar) lenf folikülleri ve lenfatik kordonlarda düzensiz dağılım gösterdikleri görülmekte. d: Arteriya sentralis. ACP-az demonstrasyonu.X460.



Şekil 97: Kontrol-1 grubuna ait dört haftalık bir civcivin dalağında alınan kriyostat kesiti. Az sayıda BG-az pozitif lenfositin (oklar) dalakta düzensiz bir yerleşim gösterdikleri görülmekte. d:arteriya sentralis. BG-az demonstrasyonu.X460.

## 10. TABLOLAR

**Tablo 4.1:** Kontrol ve Dency Gruplarının mortalite değerleri (%).

GRUPLAR	Kullanılan Yumurta Sayısı	Mortalite deęeri (%) (İnfertilite hariç)	Mortalite deęeri (%) (İnfertilite dahil)
A (Kontrol-1)	86	1,204 <sup>a</sup>	1,162 <sup>a</sup>
B (Kontrol-2)	80	7,89 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>
C (%30ETOH)	83	20,25 <sup>c</sup>	19,27 <sup>c</sup>
D (5ng AFB <sub>1</sub> )	88	41,66 <sup>d</sup>	39,77 <sup>d</sup>
E (10ng AFB <sub>1</sub> )	97	43,47 <sup>d</sup>	41,23 <sup>d</sup>
F (20ng AFB <sub>1</sub> )	97	80,43 <sup>e</sup>	76,28 <sup>e</sup>
G (40ng AFB <sub>1</sub> )	120	91,22 <sup>f</sup>	86,66 <sup>f</sup>

<sup>a-f</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen mortalite değerleri arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

**Tablo 4.2:** Kontrol ve Deneş gruplarının embriyonal gelişmenin farklı dönemlerine ait olan perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranları (%).

GRUPLAR	n	12.gün ( $\bar{X} \pm S$ )	13.gün ( $\bar{X} \pm S$ )	15.gün ( $\bar{X} \pm S$ )	18.gün ( $\bar{X} \pm S$ )	Kuluçkaadan çıkışın ilk günü ( $\bar{X} \pm S$ )	Dördüncü hafta ( $\bar{X} \pm S$ )
A(Kontrol-1)	6	20,714±0,951 <sup>a</sup>	45,800±1,48 <sup>a</sup>	32,500±0,707 <sup>a</sup>	23,500±0,707 <sup>a</sup>	63,700±0,738 <sup>a</sup>	71,487±2,32 <sup>a</sup>
B(Kontrol-2)	6	19,500±1,378 <sup>ab</sup>	42,500±1,7 <sup>ab</sup>	31,500±1,83 <sup>a</sup>	23,333±0,57 <sup>a</sup>	63,550±3,096 <sup>a</sup>	70,917±4,69 <sup>a</sup>
C(%30ETOH)	6	18,571±1,813 <sup>ab</sup>	42,250±1,3 <sup>ab</sup>	31,500±0,98 <sup>a</sup>	23,000±0,81 <sup>a</sup>	60,933±3,25 <sup>a</sup>	69,614±3,02 <sup>a</sup>
D(5 ng AFB <sub>1</sub> )	6	17,200±1,924 <sup>b</sup>	42,200±1,4 <sup>ab</sup>	25,500±0,85 <sup>a</sup>	22,500±2,12 <sup>a</sup>	60,567±2,950 <sup>a</sup>	67,150±1,89 <sup>a</sup>
E(10 ng AFB <sub>1</sub> )	6	13,600±1,140 <sup>c</sup>	42,00±2,85 <sup>ab</sup>	16,500±1,25 <sup>b</sup>	21,667±1,15 <sup>a</sup>	59,850±1,900 <sup>a</sup>	68,571±4,03 <sup>a</sup>
F(20 ng AFB <sub>1</sub> )	6	13,500±2,12 <sup>c</sup>	41,333±1,52 <sup>b</sup>	2,00±1,410 <sup>c</sup>	2,00±1,41 <sup>b</sup>	-	-
G(40 ng AFB <sub>1</sub> )	6	13,500±0,707 <sup>c</sup>	21,000±1,00 <sup>c</sup>	1,500±0,751 <sup>c</sup>	-	-	-

<sup>a-c</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken ( $p < 0,05$ ); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir ( $p > 0,05$ ).



**Tablo 4.3:** Kuluçkadan çıkışın ilk günü ve takip eden dördüncü hafta sonunda perifer kandaki lenfosit oranları ile bu hücrelerde tespit edilen ANAE pozitifite oranları (%).

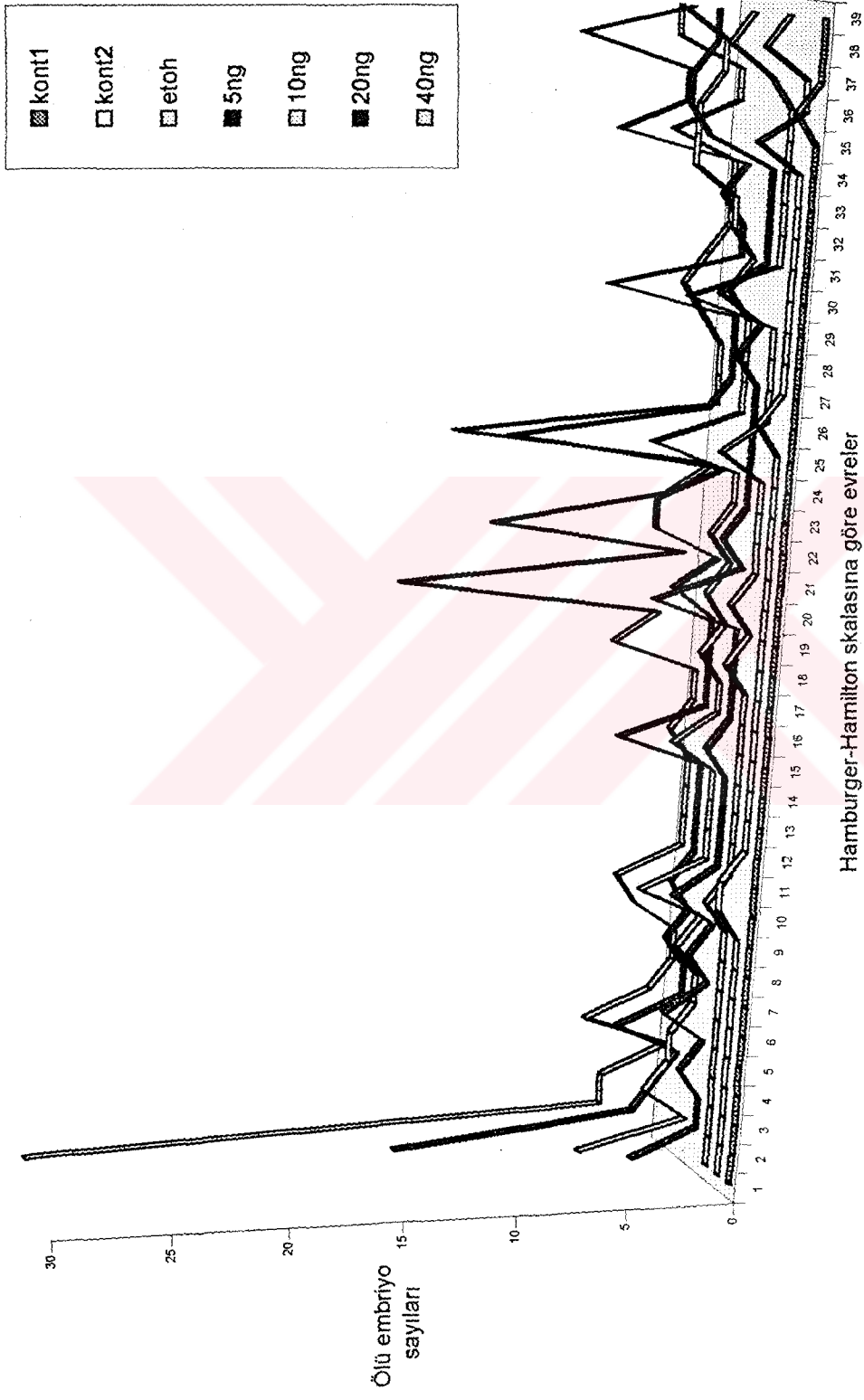
GRUPLAR	n	Kuluçkadan çıkışın ilk günündeki ANAE(+) lenfosit oranları (%)	Kuluçkadan çıkışın ilk günündeki lenfosit oranları(%)	4. haftadaki ANAE(+) lenfosit oranları (%)	4.haftadaki lenfosit oranları (%)
		$(\bar{X} \pm S)$	$(\bar{X} \pm S)$	$(\bar{X} \pm S)$	$(\bar{X} \pm S)$
A(Kontrol-1)	6	37,183±1,504 <sup>a</sup>	16,333±3,559 <sup>a</sup>	55,673±1,944 <sup>a</sup>	50,093±2,699 <sup>a</sup>
B(Kontrol-2)	6	35,350±0,940 <sup>a</sup>	15,833±2,317 <sup>a</sup>	55,911±1,821 <sup>a</sup>	51,500±2,307 <sup>a</sup>
C(%30ETOH)	6	35,283±0,327 <sup>a</sup>	15,500±1,871 <sup>a</sup>	55,478±2,465 <sup>a</sup>	50,389±3,854 <sup>a</sup>
D(5 ng AFB <sub>1</sub> )	6	34,950±1,44 <sup>b</sup>	11,500±1,970 <sup>b</sup>	55,237±2,666 <sup>a</sup>	50,217±8,186 <sup>a</sup>
E(10 ng AFB <sub>1</sub> )	6	34,867±0,979 <sup>b</sup>	11,337±1,862 <sup>b</sup>	55,412±2,105 <sup>a</sup>	49,557±5,254 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Aynı sütünde farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken ( $p < 0,05$ ); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir ( $p > 0,05$ ).

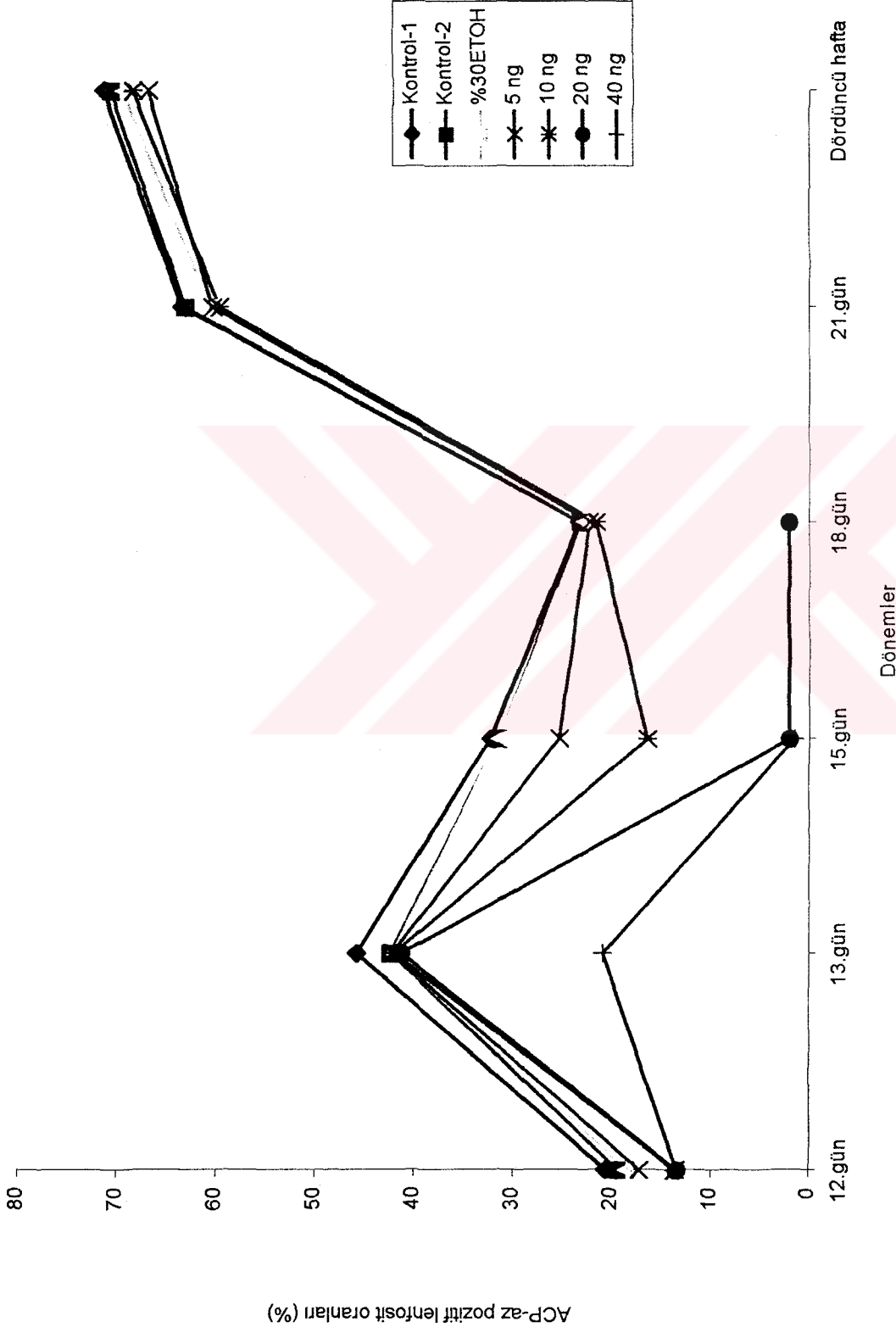
## 11. GRAFİKLER



Grafik 4.1: Kontrol ve Deneş gruplarının infertilite hariç mortalite değerleri



Grafik 4.2: Kontrol ve Deneç gruplarında sapıanan embriyonik ölümlerin Hamburger-Hamilton skalasına göre belirlenen embriyonik gelişme evrelerindeki dağılımları



Grafik 4.3: Kontrol ve Deneç gruplarında embriyonal gelişmenin farklı dönemlerinde tespit edilen perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranları.

## 12. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini tamamladıktan sonra 1989 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 1994 yılında mezun oldu. 1995 yılında aynı Fakültenin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Evlidir.



### 13. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yakın ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elemanlarına, bu çalışmada kullanılan aflatoksin B<sub>1</sub>'in temin edilmesinde emeği geçen Doç. Dr. Halis OĞUZ'a, kuluçkahanenin kullanılması, hayvanların bakımı ve beslenmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Fatma İNAL ile Yrd. Doç. Dr. Varol KURTOĞLU'na, istatistiksel hesaplamaların yapılmasında değerli bilgilerinden faydalandığım Doç. Dr. Mehmet Emin TEKİN'e ve S.Ü. Veteriner Fakültesi Zootečni ve Hayvan Besleme Bölümü Deneme Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim.

