

44489.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AFLATOKSİN B₁ VERİLMİŞ CİVCİVLERİN KARACİĞER PARENŞİMİ ÜZERİNDE IŞIK -,
FLÜORESAN - ve ELEKTRON MİKROSKOPİK ÇALIŞMALAR

Veteriner Hekim
Levent Ergün

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.Attila TANYOLAÇ

1995 - ANKARA

Bu araştırma AÜ Araştırma Fon Müdürlüğünce 92-30-00-22 Nolu Proje Olarak Desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. MATERYAL VE METOT.....	9
4. BULGULAR.....	12
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
6. ÖZET.....	36
7. SUMMARY.....	37
8. KAYNAKLAR.....	38
9. TEŞEKKÜR.....	43
10. ÖZGEÇMİŞ.....	44

1. GİRİŞ

Ülkemizde hızla gelişen bir sektör olan tavukçuluk, gerek halkımızın dengeli beslenmesi, gerekse dış satım yolu ile ekonomiye katkı sağlaması bakımından üzerinde önemle durulması gereken bir hayvancılık koludur. Ayrıca büyük sermaye gerektirmediği ve yatırımların kısa sürede kâra dönüşebildiği için de kırmızı et üretimine alternatif olmuştur.

Sektörün olumlu özellikleri, bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Bunlardan konumuzla ilgili olanı, yemlerde kimi koşullarda kendiliğinden üreyen küflerin salgıladıkları toksinlerdir. Şimdiye kadar 250'den fazla mantarın mikotoksin oluşturduğu, bunlar içinde 20 tanesinin insan ve hayvanlarda yüksek toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir. Kanatlılarda toksikozislere yol açanların başlıcaları aflatoksinler, T-2 toksin ve okratoksidir. Şiddetli bir karaciğer zehiri olarak etki yapan aflatoksin B₁'in karaciğerde meydana getirdiği değişikliklerin hücresel düzeyde ele alınması, zehirlenmeyle mücadelede bize yol gösterici olabilecek ve sonuçta, önemli bir üretim kaybının en aza indirilmesi ile sektörün gelişmesine katkı sağlanabilecektir.

Kanatlı aflatoksikozisinde, karaciğerdeki lezyonlar konusunda elde edilen bilgiler, hepatositlerde görülen değişikliklerle sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada, hepatositlerle birlikte perisinüzoidal, endotel ve Kupffer hücrelerinin ne şekilde etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca, karaciğer A vitamini sentezi yönünden de önem taşımaktadır. Bu amaçla adı geçen toksinin, karaciğerin tüm hücrelerinde meydana getirdiği lezyonlar ile A vitamini metabolizmasında şekillendirdiği etkiler ışık-, flüoresan - ve elektron mikroskobu düzeyinde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Tavuklarda karaciğer yağlanması, beslenme (1,5,11,63) ile çevre faktörleri yanında genetik ve toksik (24,32,35,36,37,47,57) nedenlerin yol açtığı ortaya konmuştur.

Aflatoksin duyarlılıkta türler arasında büyük farklılıklar bulunmakla birlikte, primer toksisitenin görüldüğü organ hepsinde karaciğerdir (37,53). Karaciğerin büyümesi için tespit edilen eşik toksin dozunun diğer organlardan daha düşük olduğu ve 21. güne ulaşan broylerler üzerindeki bütün parametrelerin kanatlı aflatoksikozisinde başlıca hedef teşkil ettiği saptandığından (37,57), bu organın aflatoksinin etkisine en duyarlı organ olduğu anlaşılmıştır (14,35,36,37,44,57).

Aflatoksikozise bağlı olarak amino asit ve lipid metabolizmasıyla ilgili karaciğer enzimlerinin aktivitelerindeki olumsuz değişiklikler, kuluçka sonrası ilk 3-4 hafta içerisinde meydana gelir. Cıvcıvlerde lipogenezis birinci günde başlar, ilk hafta boyunca en yüksek düzeye ulaşır ve üçüncü haftadan olgunluk dönemine kadar kademeli olarak azalır. Eğer aflatoksin etkisinde kalınırsa, karaciğer lipid fraksiyonundaki mevcut yağ asitleri artar. Kanatlıların toksine en duyarlı oldukları dönem kuluçkadan çıktıktan sonraki ilk üç haftadır (44).

Piliçlerde aflatoksikozisin karaciğerdeki makroskopik bulguları nodüller, hematomlar ve ekimotik hemorajiler ile soluk sarı renkteki görünümüdür (47,55). En önemli mikroskopik değişiklikler ise karaciğer epitel hücrelerinde dejenerasyon, vakuolizasyon, büyüme ve nekroz, sinuzoidal konjesyon (35,47,55) ile safra kanalı epitellerinin kümelenme biçimindeki proliferasyonudur (14,47). İnterselüler safra kanalcıkları, mikrovilluslarındaki azalma yanında genişleme de

gösterirler (24,35). Portal bölgede, vena porte'den gelen mononükleer hücre infiltrasyonu vardır. Sinuzoidler genişlemişlerdir ve bol miktarda lökosit içerirler (10,35,58).

İlk üç hafta boyunca hepatositlerde yağ depolanması piliçler için çok fazla tehlike yaratmamaktadır (14,43). Portal bölgelerdeki hücrelerde yağ değişiklikleri daha belirgin olup (46,57,61) hücre duvarlarını ve çekirdeklerini kaybeden üç veya dört hücreli grupların birbirleriyle birleşmesi sonucu fokal yağ alanları meydana gelir (14).

Yirmibirinci günde lipid damlacıkları bazı hepatositlerde önemli miktarlara ulaşırken, diğerlerinde hiç görülmeyebilir. Sitoplazması lipid damlacıklarıyla dolu olan hepatositlerde, mitokondriyonlar hariç, diğer organellerdeki değişiklikleri ayırt etmek güçleşir. Karaciğer epitel hücrelerinde mitokondriyal anomaliler de görülür (35). Bazı hücrelerin çekirdekleri piknotik ve kenara itilmiş durumdayken, çoğu çekirdekler ortadan kaybolur. Dağılıp bütünlüğü bozulan hepatositler, yassılmış çekirdekleri ve çok az bazofilik sitoplazmaları ile hücre adacıkları meydana getirirler (14).

Aflatoksin B₁, total karaciğer proteinlerinde hızlı bir azalma meydana getirmektedir (42,53). Hepatositlerin polizomlarında bozulma ile bu bozulmayla orantılı olarak monomer ve dimer sahalarında artışlarla beraber (53), granüllü endoplazma retikulumunun paralel görünümündeki düzensizlikler ve degranülasyon RNA, DNA ve protein sentezinin inhibisyonuna atfedilmiştir (24,35,37). Aflatoksin, yağ asidi sentezinde gerekli olan enzimlerin oluşumunu engellemek suretiyle lipogenezis üzerine etki etmektedir (25). Yağ asidi sentezindeki azalmaya, karaciğerde lipid birikimi eşlik eder (57). Buna bağlı olarak hepatik lipidlerin periferel dokulara taşınması baskılanır (25).

Aflatoksin B₁'in karaciğer tarafından selektif olarak alındığı bilinmekle beraber (37), bu toksinin sitoplazma ve çekirdekteki geçici yerleşimi henüz açık değildir. Ancak hepatositlerden hızla metabolize edilerek atıldığı gösterilmiştir (19,20).

Aflatoksin B₁ hedef hücre içine girdikten sonra sitoplazmik bir bağlayıcı protein tarafından alınarak, mikrozomlara yerleştirilmiş olabilir (20). Aslında aflatoksin B₁'in kendisi değil, mikrozomlar tarafından metabolize edilmesiyle ortaya çıkan epoksit türevleri etkilidir (66). Meydana getirilen epoksit türevlerinin büyük çoğunluğu detoksifiye edilir ve hızla hücreden uzaklaştırılır. Geri kalanı ise endoplazma retikulumunda modifiye edildikten sonra mitokondriyonlar ile çekirdeklerdeki DNA, RNA ve proteinlerin nükleofilik bölgelerine kovalent (dönüşümsüz) olarak bağlanır (20,21,73).

Kupffer ve endotel hücreleri, hepatik sinuzoidlerde dolaşımdan gelen çeşitli maddelerin ortadan kaldırılmasından sorumludur. Dan ve Wake (23), in vivo deneylerde latex partiküllerinin endotel hücreleri tarafından fagosite edilmediğini, ancak in vitro ortamda fagositoz gösterdiğini, Kupffer hücrelerinin ise hem in vivo hem de in vitro ortamda fagositoz yapabildiğini, bu yüzden endotel hücrelerinde latex partiküllerinin endositik mekanizmasının Kupffer hücrelerinden farklı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Aflatoksin B₁, bağışıklık sistemi üzerine de etkilidir. Piliçlerde, bu toksinle kontamine yem tüketimine bağlı olarak nötrofil granüositlerin sayısında artma, bazofil granüositler, lenfositler, monositler ve trombositlerin miktarlarında azalmalar görülür. Eozinofil granüositlerde ise herhangi bir değişiklik meydana gelmez (46,65).

Aflatoksikozisde, nötrofil granüositlerin ve makrofajların fagositoz yapmaları için gerekli olan komplementin aktivitesi zayıflar (15,16,17,18,27,59). Bu hücrelerin fagositoz aktivitesi komplemente bağlı olduğundan, yemlerdeki çok düşük aflatoksin düzeylerinden bile (0.625 ppm) olumsuz şekilde etkilenirler (15,29,46).

Aflatoksin, piliç karaciğerinde lizozomal enzimlerin spesifik aktivitelerinde hızlı bir artışa yol açar (64). Bu yüzden doku dayanıklılığı ve bütünlüğü dozla orantılı olarak azalır (62). Lizozomal enzimler, immunglobulinlerin yıkımlanmasına neden olmak suretiyle humoral bağışıklık üzerinde de olumsuz etkiler yaratırlar (62).

Piliçlerin aflatoksikozisi, selüler ve humoral bağışıklık sistemini yukarıda anlatıldığı şekilde bozduğundan, hayvanların tavuk kolerası, marek hastalığı, salmonellozis, aspergillozis, koksidiozis gibi hastalıklara (16,27,28,45) duyarlılıkları artar.

Aflatoksin B₁ ve retinol, karaciğerde, aynı mikrozomal enzimlere substrat olarak etki yaparlar. Bu yüzden retinolün mikrozomal enzim komponentleri ile spesifik etkileşimi, aflatoksin B₁ metabolizmasını değiştirmektedir (26). Sonuç olarak da retinolün, bu toksinin olumsuz etkilerine karşı koruyucu bir rol oynadığı (9,13,22) ileri sürülmüştür. Ancak toksin, karaciğer vitamin A düzeylerini epitel hücrelerinde aşırı yağlanmaya bağlı olarak düşürür (13,14,33,50). Toksik yem tüketen piliçlerde vitamin A düzeyi düşük seviyede de olsa devam eder (14).

Retinol düşük moleküler ağırlıkta, yağda eriyen, membranlar içinde kitleler halinde bulunabilen, proteinlere bağlanabilen, transport amacıyla lipoproteinler içinde uzun zincirli yağ asitlerine esterleştirilebilen veya sitoplazmik lipid damlacıklarında depolanabilen bir primer alkoldür (12).

Kan plazmasındaki vitamin A'nın hücreler arasında taşınması, şilomikronlarla ve retinolün bağlanması için özelleşmiş proteinlerle (retinol bağlayan protein:RBP) gerçekleşir. Hücre içerisinde ise esterleşmemiş retinol, en az iki proteine daha spesifik olarak bağlanır. Bunlar, hücresel retinol bağlayan protein (CRBP) ve hücresel retinol bağlayan protein tip II (CRBP-II)' dir (12). CRBP, hepatositler ve perisinuzoidal hücreler başta olmak üzere vücudun hemen bütün hücrelerinde mevcuttur. CRBP-II ise sadece ince barsakların olgun absorbtiv enterositlerindeki villuslarda bolca bulunur (12,51) ve miktarı ise ratlar için günlük vitamin A gereksinimine hemen hemen eşittir (12).

Yakın zamana kadar retinol bağlayan protein (RBP) sentezinin yapıldığı tek yerin hepatositler olduğu sanılıyordu. Bugün ise diğer dokulardaki hücrelerde de RBP için mRNA bulunduğu saptanmıştır (2,56).

Retinolün hücreye alınma mekanizması halen inceleme aşamasındadır. RBP için bir hücre yüzeyi reseptörü izole ve karakterize edilememiştir. Varsayılan reseptör tanımlanana kadar öngörülen diğer mekanizmaların gözardı edilmemesi gerekir (12).

Klasik bilgilerimize göre, şilomikronlar içerisinde paketlenmiş retinil esterlerinin hepsi karaciğer tarafından alınır. Son yıllarda ise bir kısmının böbrekler, yağ dokusu, akciğerler, böbreküstü bezleri ve iskelet kası tarafından da alındığı bildirilmektedir (12,70).

Karaciğer hücre tiplerinden iki tanesi olan hepatositler ve perisinuzoidal hücreler, vitamin A metabolizmasında görevlidirler (3,4,6,7,12,68,69). Hepatositler, şilomikronlardan aldıkları retinil esterlerinin işlenmesinde, RBP'nin üretilmesinde ve RBP-retinol kompleksinin plazmaya verilmesinde önemli rol oynarlar (12,39).

Şilomikron retinil esterlerinin çoğu, büyük bir olasılıkla hepatositlerdeki reseptörler aracılığı ile alınır (12). Perisinuzoidal hücrelerin ise karaciğer fibrozisinin gelişimi sırasında gözlenen patolojik değişikliklerle ilgisi bulunabilir (12,41); ayrıca vitamin A yönünden yeterli düzeyde beslenen insan ve hayvanlarda retinil esterlerinin depolandığı hücrelerdir (3,4,6,7,12,40,69).

Şilomikronların, hepatositler üzerindeki reseptörlere bağlanmasından sonraki işlemler hakkında henüz çok az şey bilinmektedir. Alınan retinil esterlerinin hidroliz edilmesiyle oluşan retinol, granüllü ve granülsüz endoplazma retikulumuna gelir. Bugünkü bilgilerimizle, retinolün endoplazma retikulumuna taşınmasında en az iki mekanizmanın bulunduğu sanılmaktadır. Bunlar CRBP ve endositik veziküllerdir. CRBP, granüllü ve granülsüz endoplazma retikulumunda bol miktarda bulunur. CRBP-retinol kompleksinin endoplazma retikulumundan Golgi kompleksine taşınmasını hücreden sekresyonu izler (12).

Yeni alınmış retinolün, hepatositlerden perisinuzoidal hücrelere gönderilmesi A vitamini için spesifiktir. Diğer yandan sözkonusu vitaminin noksanlığında, retinolün ya çok azı perisinuzoidal hücrelere taşınır ya da taşınmadan, hızla hepatositlerden hedef hücrelere ulaştırılmak üzere kan dolaşımına verilir. A vitamini eksikliği bulunmayan hayvanlarda ise hepatositlerden hızlı bir şekilde salgılanmış olan retinolün büyük bir kısmı perisinuzoidal hücrelere gönderilir (12).

CRBP, retinolün karaciğerde esterleştirilmesinde önemlidir. Hepatositler ve perisinuzoidal hücrelerde bulunan bu hücre içi taşıyıcı proteinlerin konsantrasyonu, normal koşullarda perisinuzoidal hücrelerde çok daha yüksektir (12).

Yapılan alışmalar, plazmadaki total retinolün ancak %55'inin karaciğer, geri kalanının ise diğer organlar tarafından alındığını göstermektedir (12,52). Vitamin A eksikliği olan ratlarda ise, verilen retinolün yaklaşık yarısı böbreklere taşınmaktadır Bu da, vitamin A metabolizmasında böbreklerin çok önemli rol oynadığını gösterir (52).

Karaciğer ve diğer organlarda vitamin A uzun süre minimal düzeyde kaldığı halde, plazma retinol seviyesinin normal bir konsantrasyon dağılımı gösterdiği gözlenmiştir (30). Kan plazmasına retinolün giriş ve çıkışını düzenleyen bir mekanizmanın var olduğu düşünülmektedir. Ancak bunu neyin, nerede ve nasıl kontrol ettiği bilinmemektedir (12). Yakın zamana kadar karaciğerin, plazmaya retinol verilmesinden sorumlu tek organ olduğu, plazmadaki retinol düzeyinin homeostazisinin retinolün karaciğerden salgılanması ile regüle edildiği düşünülüyordu. Bugün ise olayın çok daha karmaşık olduğu anlaşılmıştır. Konuyla ilgili çeşitli yorumlar yapılmaktadır. Ekstrahepatik dokularda retinolün kullanımı veya alınmasının bir uyarım meydana getirmesi sonucu, retinolün karaciğerden sekresyonunun gerçekleştirilebildiği (12), diğer yandan vitamin A metaboliti olan retinoik asidin (34) muhtemel etkisi olarak, karaciğer tarafından retinol sekresyonunda bir azalma meydana getirdiği (49) ve karaciğerden başka diğer organlarda da retinol-RBP kompleksi sekresyonunu azaltabildiği ileri sürülmüştür (12). Yine böbrekler, plazma retinol düzeylerini belirlemede önemli rol oynayabilirler (52).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden sağlanan "kullanma melezi ticari tavuk" tipinde "Ross" ırkı broyler civcivler kullanıldı. Bu hayvanlar günlük civciv olarak laboratuvara getirilerek, 35°C'lik sıcaklığın sağlandığı ısıtma tertibatlı kafeslerde bakım ve beslenmeye alındılar.

Çalışma boyunca toplam 30 hayvan kullanıldı. Bunlar, kontrol ve deneme grupları şeklinde 15'erli iki ana gruba, her grup da kendi arasında 5'erli üç alt gruba ayrıldılar.

Kontrol grubundaki 15 civcivden ilk 5 adedine aflatoksin B₁ içermediği belirlenen normal civciv yemi, ikinci 5 adedine birinci hafta sonunda normal yeme ek olarak toplam 500.000 IU vitamin A palmitat¹ subkutan verildi; üçüncü alt gruptaki 5 adet civcive ise normal yem ile birlikte, kesimden 5 saat önce V.subcutanea ulnaris'den 0.05 ml/100 g dozda (71), partikül çapı 0.3 µm olan latex'in aköz süspansiyonu enjekte edildi.

Deneme grubundaki 15 hayvanın hepsine de 4 ppm aflatoksin B₁² içerdiği saptanan civciv yemi yedirildi. Bunlardan ilk beş adedine beslenme periyodu boyunca başka bir uygulama yapılmadı. İkinci 5 adetlik gruba birinci haftanın sonunda toplam 500.000 IU vitamin A palmitat subkutan tatbik edildi; üçüncü 5 adetlik deneme grubuna ise kesimden 5 saat önce, 0.05 ml/100 g dozda (71), partikül çapı 0.3 µm olan latex'in aköz süspansiyonu V.subcutanea ulnaris'den enjekte edildi.

¹Vitamin A palmitat.Roche.İsviçre-Basel

²Aflatoksin B₁.Sigma Chemical Company,USA.

Hayvanlara üç hafta boyunca ad libitum yem ve su verildi. Belirtilen sürenin bitiminde, bütün hayvanlardan alınan karaciğer örnekleri ışık -, flüoresan - ve elektron mikroskopik incelemeler için çeşitli işlemlere tabi tutuldular.

3.1. Aflatoksin B₁ İçeren Rasyonun Hazırlanması :

Normal civciv yemine Aflatoksin B₁ katılmadan önce yarı-nicel analiz yöntemi (60) uygulandı ve söz konusu toksinin bulunmadığı saptandı. Daha sonra *Aspergillus flavus*'dan elde edilmiş olan 36 mg aflatoksin B₁ (C₁₇H₁₂O₆), bağlayıcı nitelikteki eşit miktar mısır nişastası ile karıştırıldı. Bu karışım 9 kg yem ile homojenize edildi ve alınan yem örneğinin, yine yarı-nicel analiz yöntemi gerçekleştirilerek, 4 ppm aflatoksin B₁ içerdiği tespit edildi. Toksinli ve kontrol rasyonları, deney süresince +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.2. Işık Mikroskopik İncelemeler İçin :

Her olguda karaciğerin çeşitli bölgelerinden alınan parçalar, Baker'in (54) % 10 formol-kalsiyum tespit solüsyonunda +4°C'de ve karanlıkta 16 saat tespit edildiler. Bu parçalardan elde edilen 12 µm kalınlığındaki kriyostat kesitlerine, yağların demonstrasyonu için sudan III (54), sudan black B (54) ve oil red o (8) boyamaları uygulandı. Vitamin A depolayan hücrelerin lokalizasyonunu göstermek amacıyla da altın impregnasyonu (3,68) yapıldı.

3.3. Flüoresan Mikroskopik İncelemeler İçin :

Vitamin A'nın karaciğerde histokimyasal demonstrasyonu amacıyla, flüoresan mikroskopta 10-20 saniye süreyle gösterdiği sarı yeşilimsi renkteki spesifik primer flüoresansdan yararlanıldı (3,54). Bu amaçla, her olgudan alınan parçalar, Baker'in (54) %10 formol-kalsiyum

tespit solüsyonunda +4°C'de ve karanlıkta 16 saat süreyle tespit edildiler. Bu parçalardan elde edilen 12 µm kalınlığındaki kriyostat kesitleri temiz lamalar üzerine alınarak distile su ile kapatıldılar. Zaman geçirilmeden, HBO 50 W merkürü lambası olan Carl Zeiss marka epiflüoresan mikroskopta incelendiler.

3.4. Elektron Mikroskopik İncelemeler için :

Çalışmada her civcivden alınan karaciğer örneklerinin yarısı, Karnovsky (38) yöntemine göre glutaraldehid-paraformaldehid ön tespitinde (pH 7.4) +4°C'de 19 saat bekletildi, 0.1 M kakodilat tamponunda 3 saat yıkandı ve ozmik asitte iki saat süre ile ikinci kez tespit edildi. İkinci tespitten sonra parçalar, %1'lik uranil asetat solüsyonunda 2 saat bırakılıp dereceli alkoller ve propilen oksitten geçirilerek araldit M'de bloklandılar. Bu bloklardan alınan 400-600 Å kalınlığındaki ince kesitlere Venable ve Coggeshall (67) yöntemine göre kontrast boyama uygulandı.

Karaciğer örneklerinin diğer yarısı ise elektron mikroskopta altın klorür reaksiyonunu (3,68) demonstre etmek için kullanıldı. Bu parçalar da Karnovsky (38) yöntemine göre glutaraldehid-paraformaldehid tespit solüsyonunda +4°C'de 3 saat tespit edilip distile suda kısa bir yıkamadan sonra % 0.02'lik aköz altın klorürde karanlıkta ve oda ısısında 19 saat bırakıldılar. Distile suda yıkanan parçalar, ozmik asitte iki saat süre ile ikinci kez tespit edildiler; dereceli alkoller ve propilen oksitten geçirilerek araldit M'de bloklandılar. Bu bloklardan elde edilen kesitlerden bir bölümüne kontrast boyama uygulandı, diğer bölümü ise boyanmaksızın kullanıldı. Bloklardan alınan ince kesitler, Carl Zeiss EM 9S-2 model elektron mikroskopta incelendi.

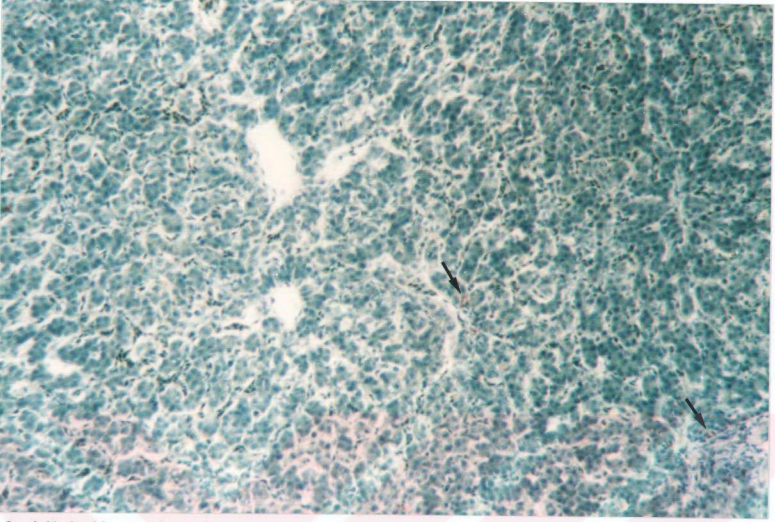
4.BULGULAR

4.1.Işık Mikroskopik Bulgular

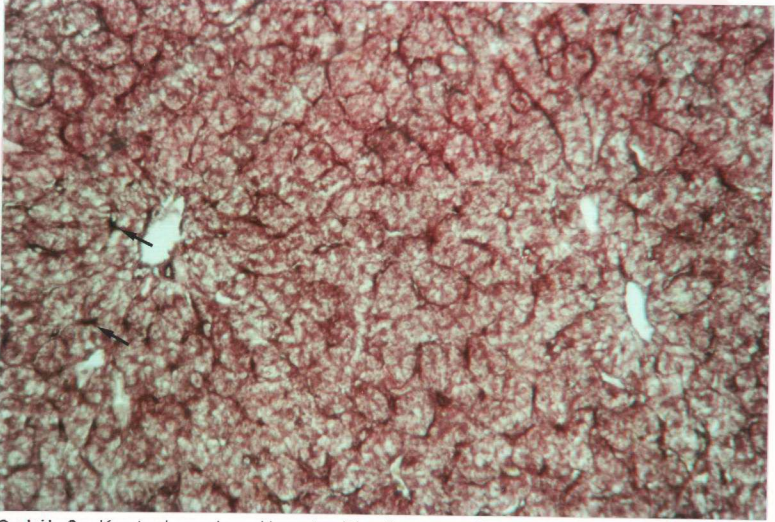
Aflatoksinsiz civciv yemi ile beslenen ve vitamin A verilmeyen kontrol grubuna ait hayvanların sudan III ve altın klorürle boyanan karaciğer kesitlerinde hepatositler negatif, az sayıdaki perisinuzoidal hücreler ise pozitif reaksiyon gösterdiler (Şek.1,2,oklar).

Deneme grubunda, aflatoksin B₁'li civciv yemi ile beslenen hayvanlara ait kesitlerde, hepatositlerde bulunan lipid içeriğinin sudan III, oil red o ve sudan black B'ye karşı pozitif (Şek.3,4,5), altın klorüre negatif reaksiyon gösterdiği saptandı. Yağlanma, başta lopçukların 1.bölgesinde daha yoğun olmak üzere, organın her tarafında bol miktarda görüldü (Şek.3). Hepatositlerde önemli miktarlara ulaşan lipid damlacıklarının birbirleriyle birleşmesi sonucu giderek daha büyüdüleri, hücre duvarlarını ve çekirdeklerini kaybettikleri izlendi. Tamamen yağ ile dolmak suretiyle dejenere olmuş hepatositler, kaynaşarak daha büyük yağ odakları meydana getirdiler (Şek.4,5,6,oklar). Portal bölgede yer yer mononükleer hücre infiltrasyonlarına da rastlandı (Şek.7). Yağlanma ve hücre infiltrasyonlarına bağlı olarak epitel hücre kordonları bozulmuştu. Karaciğerin aşırı yağlanması, perisinuzoidal hücrelerin ışık mikroskopik düzeyde görülmelerini maskeleydi.

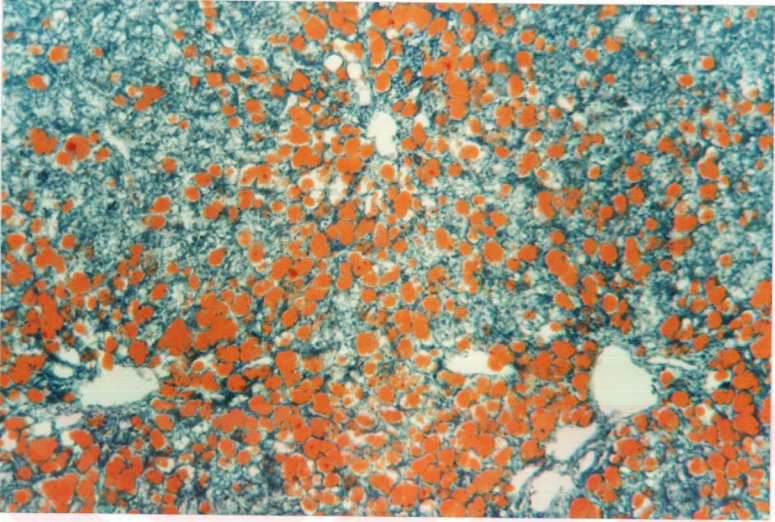
Kontrol grubunda A vitamini verilen hayvanların altın klorür, sudan III ve sudan black B ile boyanan karaciğer kesitleri incelendiğinde, hepatositler her üç boyamaya negatif, perisinuzoidal hücreler ise pozitif reaksiyon gösterdiler (Şek.8,9,10,oklar).



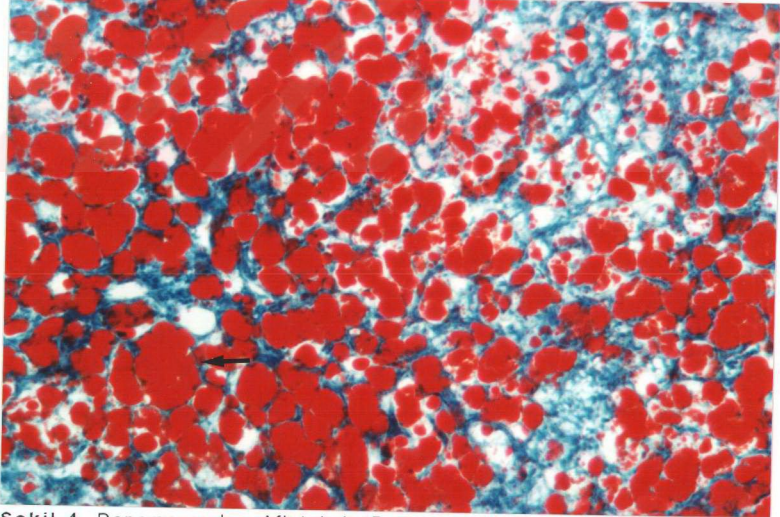
Şekil 1. Kontrol grubu. Hepatositlerde negatif reaksiyon, sudan III pozitif hücreler (oklar). Sudan III. x 900.



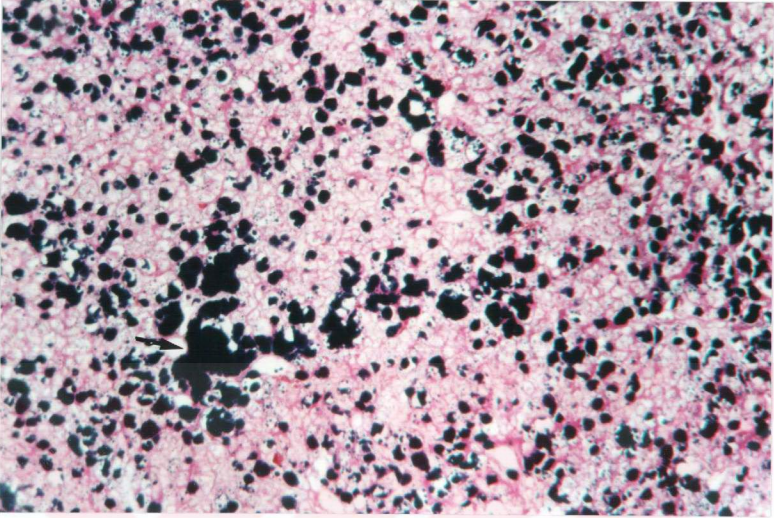
Şekil 2. Kontrol grubu. Hepatositlerde negatif reaksiyon, altın klorür pozitif hücreler (oklar). Altın klorür. x 1000.



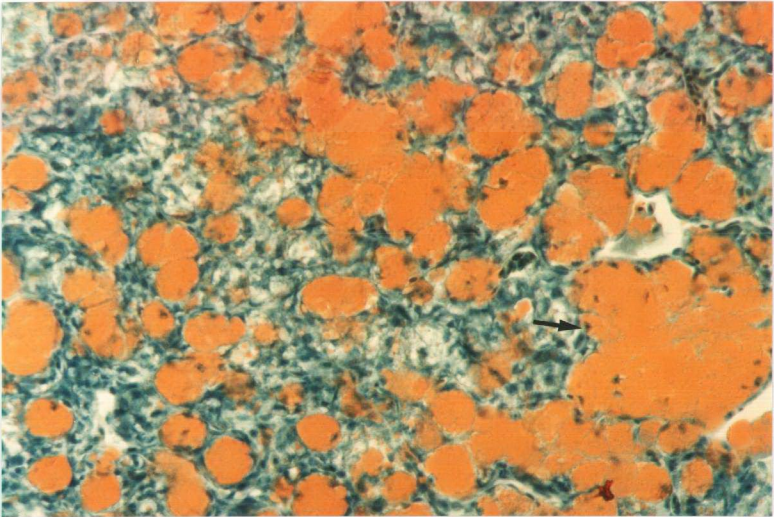
Şekil 3. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Hepatositlerde sudan III pozitif lipid damlacıkları görülmekte. Sudan III. x 600.



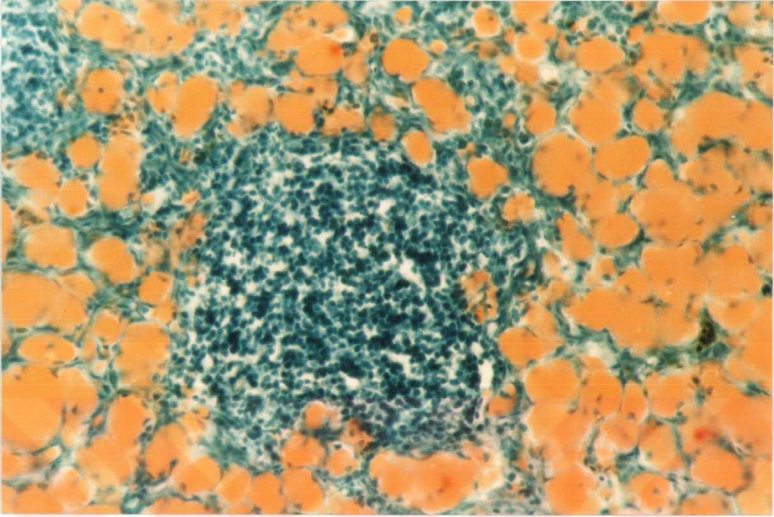
Şekil 4. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Hepatositlerde oil red o pozitif lipid damlacıkları görülmekte, (ok) yağ odağı. Oil red o. x 900.



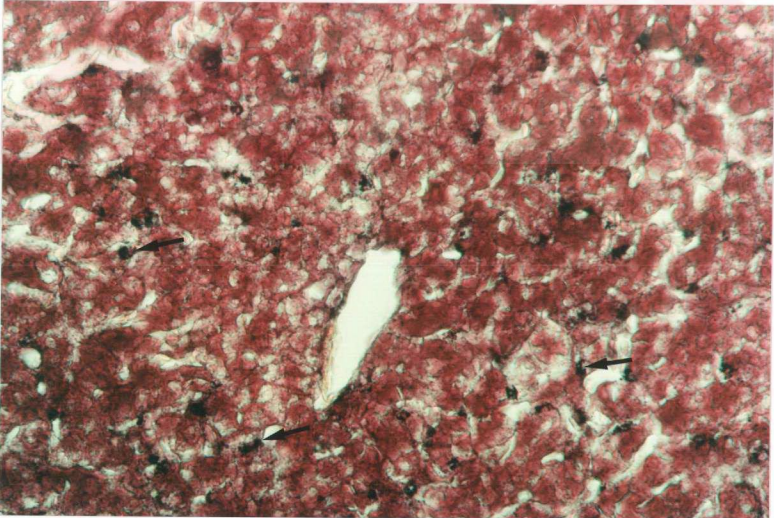
Şekil 5. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Hepatositlerde sudan black B pozitif lipid damlacıkları görülmekte, (ok) yağ odağı. Sudan black B. x 600.



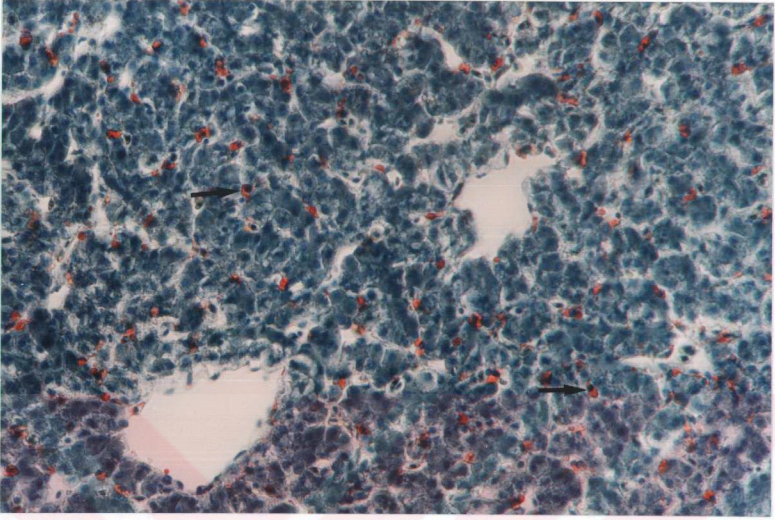
Şekil 6. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: (Ok) yağ odağı. Sudan III. x 1400.



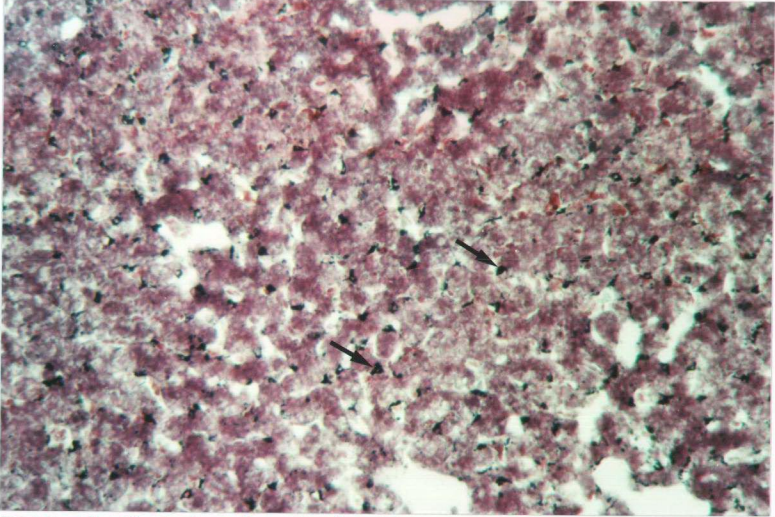
Şekil 7. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenme sonucu portal bölgedeki mononükleer hücre infiltrasyonu. Sudan III. x 1400.



Şekil 8. Kontrol grubu. A vitamini verilmesinden sonraki durum: Hepatositler negatif, perisinuzoidal hücreler (oklar) pozitif reaksiyon göstermekte. Altın klorür. x 1400.



Şekil 9. Kontrol grubu. A vitamini verilmesinden sonraki durum: Hepatositler negatif, perisinuzoidal hücreler (oklar) pozitif reaksiyon göstermekte. Sudan III. x 1450.



Şekil 10. Kontrol grubu. A vitamini verilmesinden sonraki durum: Hepatositler negatif, perisinuzoidal hücreler (oklar) pozitif reaksiyon göstermekte. Sudan black B. x 1000.

Aflatoksin B₁'li yemle beslenen ve kesimden 15 gün önce A vitamini verilen deneme grubunda, aşırı yağlanmaya bağlı olarak hepatositler sudan III, sudan black B ve oil red o boyamalarına karşı pozitif, altın klorüre ise negatif reaksiyon gösterdiler. Yağla dolu hepatositlerin çekirdekleri kenara itilmiş (Şek.11,oklar) olup çoğu çekirdekler ortadan kaybolmuştu. Yağlanma ve lenfosit infiltrasyonları epitel hücre kordonlarının bozulmasına yol açtı. Işık mikroskopik düzeyde perisinuzoidal hücreler görülemedi.

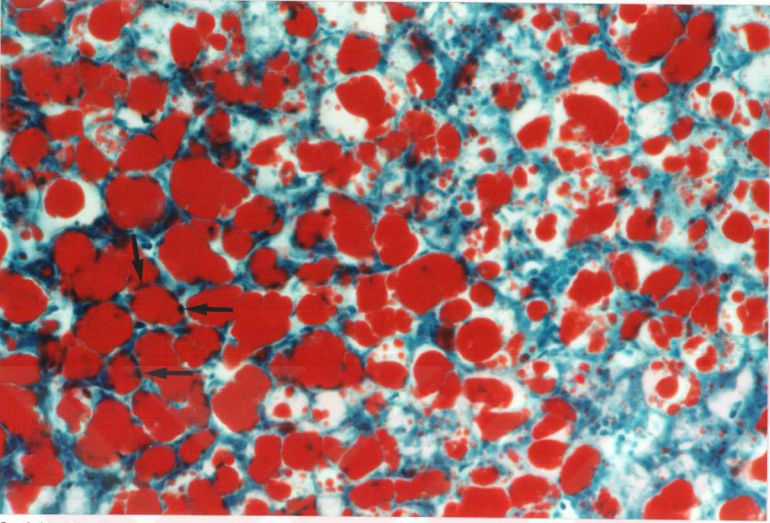
4.2. Flüoresan Mikroskopik Bulgular

Vitamin A flüoresan mikroskopta 10-20 saniyede kaybolan sarımsı-yeşil renkteki primer-spesifik flüoresans vermesi ile tanındı.

Kontrol grubunun aflatoksinsiz civciv yemi ile beslenen ve vitamin A verilmeyenlerinde karaciğer kesitleri, zayıf flüoresans gösterdi. Deneme grubunun aflatoksin B₁'li civciv yemi tüketenlerine ait karaciğer kesitlerinde ise flüoresans çok daha az idi.

Kontrol grubunun A vitamini verilmesinden 15 gün sonra kesilen hayvanlarına ait karaciğer örneklerinin, bu vitamine, kısa zamanda kaybolan kuvvetli flüoresans verdikleri saptandı (Şek.12). Yine aflatoksin B₁'li civciv yemi ile beslenirken, kesimden 15 gün önce A vitamini verilen deneme grubunun karaciğer kesitlerinde ise A vitamini verilen kontrol grubuna göre daha az, ama bu vitaminin verilmediği kontrol grubuna göre daha fazla flüoresans görüldü.

Kontrol ve deneme gruplarına ait hepatositlerin, flüoresan mikroskop ile yapılan incelemelerinde flüoresans vermedikleri saptandı.



Şekil 11. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenirken A vitamini verilmesinden sonraki durum: Hepatosit çekirdekleri kenara itilmiş (oklar). Oil red o. x 1300.



Şekil 12. Kontrol grubu. A vitamini verilmesinden sonraki durum: Bu vitamini kuvvetli fluoresans görülmekte. x 900.

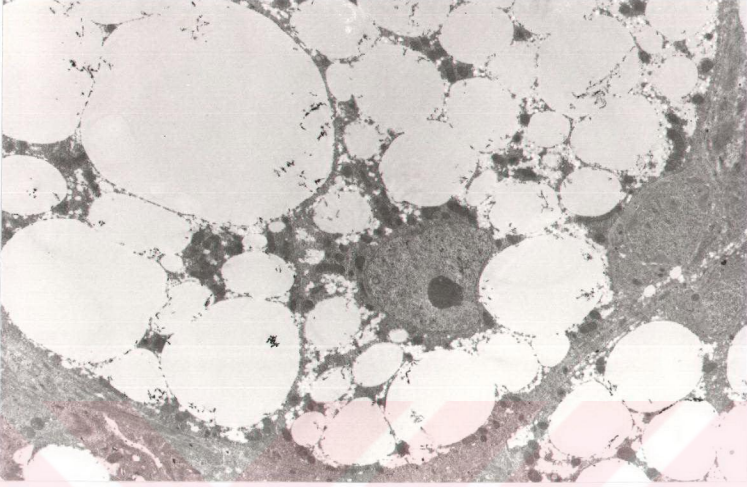
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

Aflatoksinli yem tüketen piliçlerin hepatositlerindeki lipid damlacıkları çok büyük miktarlara ulaşırken (Şek.13), bazı hücrelerde önemsiz sayılacak düzeydeydi (Şek.14). Bir kısmı ise toksinden hiç etkilenmemişlerdi.

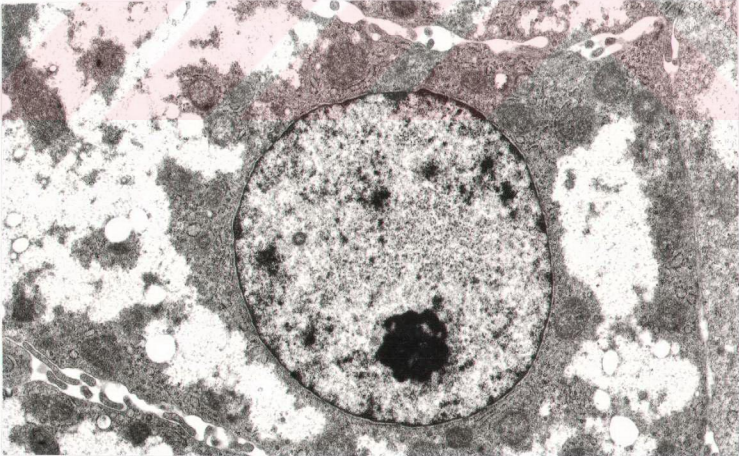
Karaciğer dokusunda, tamamen yağ ile dolmuş hepatositlerin topluluklar halinde buldukları ve yağ odakları meydana getirdikleri görüldü. Hepatosit çekirdeklerinin solgun renkte olduğu ve çekirdekçiklerin ise gayet belirgin görünüşleriyle eksantrik konumda buldukları izlendi (Şek.15,ok). Yağ ile dolmuş sitoplazmaları yüzünden kenara itilmiş biçimsiz görünümlü hepatosit çekirdeklerine sıklıkla rastlandı (Şek.16,ok).

Deneme grubuna ait hepatositlerin mitokondriyonları (Şek.18,m), kontrol grubuna (Şek.17,m) göre daha küçüktü. Hepatositlerdeki lipid kitlesi yüzünden, granüllü endoplazma retikulumunun paralel düzeni bozulmuştu. Kontrol grubu (Şek.19,oklar) ile karşılaştırıldığında ribozomlarının sayıca azaldığı (Şek.20,ok), interselüler safra kanalcıklarına ait mikrovillusların da kontrol grubundakilere göre (şek.17,s) yer yer kaybolduğu (Şek.21,ok) görüldü.

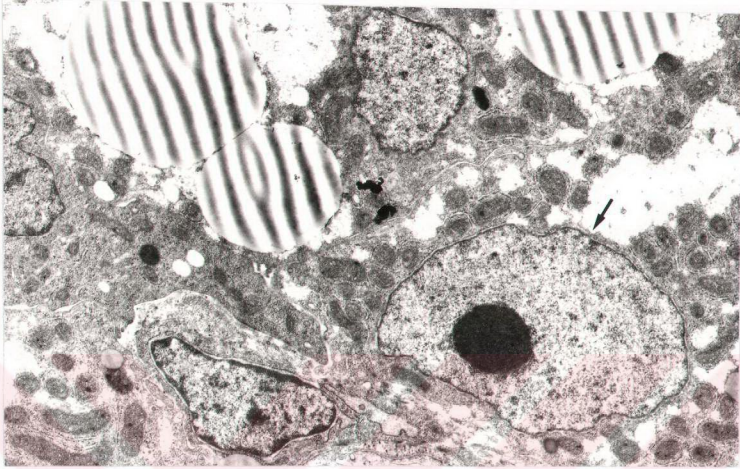
Karaciğer epitel hücrelerindeki dejenerasyon, vakuolizasyon ve şişmeye bağlı olarak, sinuzoidlerin endotelial hücre duvarının bozulduğu gözlemlendi.



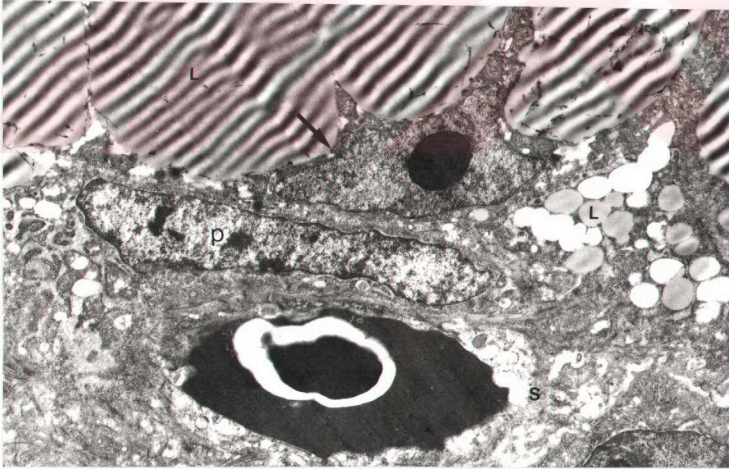
Şekil 13. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Hepatositlerde fazla miktardaki lipid damlacıkları. x 4600.



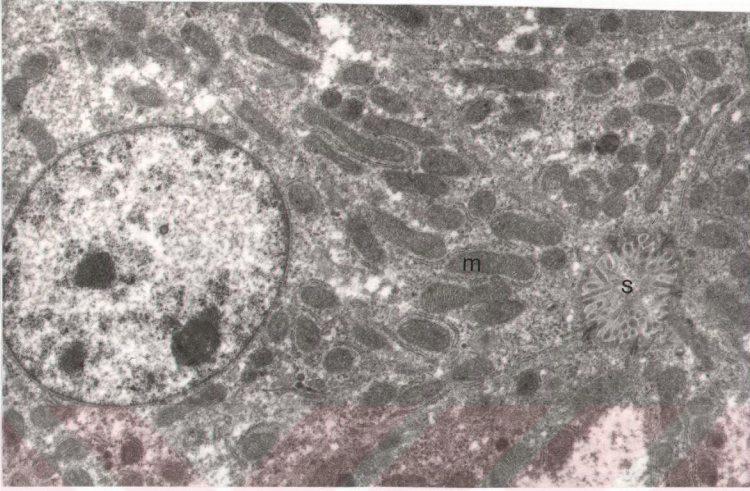
Şekil 14. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonra hepatositte önemsiz sayılabilecek düzeydeki lipid damlacıkları. x 13700.



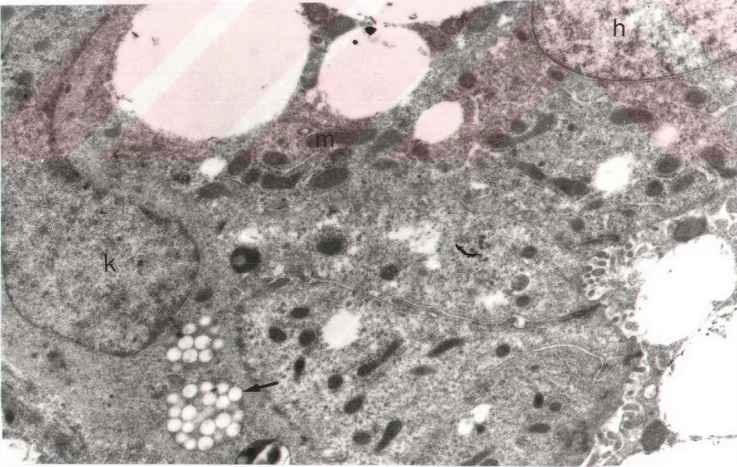
Şekil 15. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Solgun hepatosit çekirdeği (ok) ve eksantrik konumlu çekirdekçığı görülmekte. x 11000.



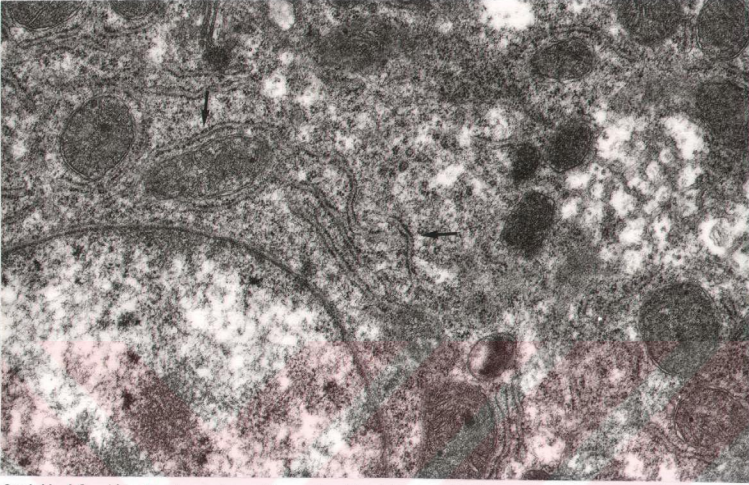
Şekil 16. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: Kenara itilmiş biçimsiz görünümlü hepatosit çekirdeği (ok), sinuzoid (s), perisinuzoidal hücre (p), lipid damlacıkları (L). x 7400.



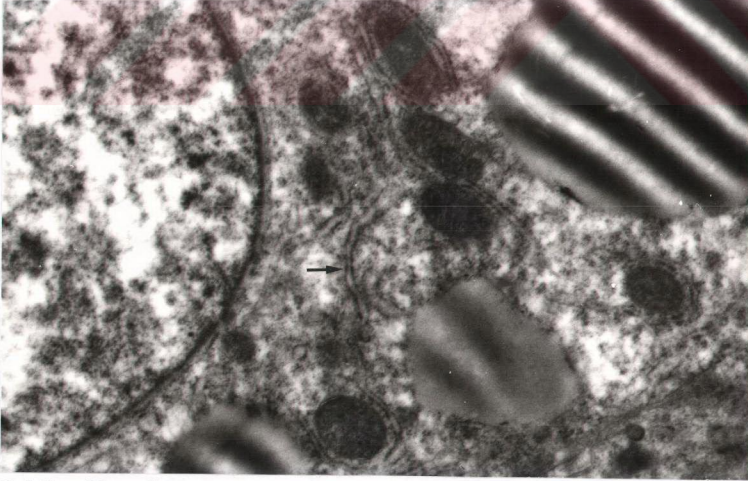
Şekil 17. Kontrol grubu. Hepatositlerde normal büyüklükteki mitokondriyonlar (m) ile safra kanalcıklarına ait mikrovilluslar (s). x 12000.



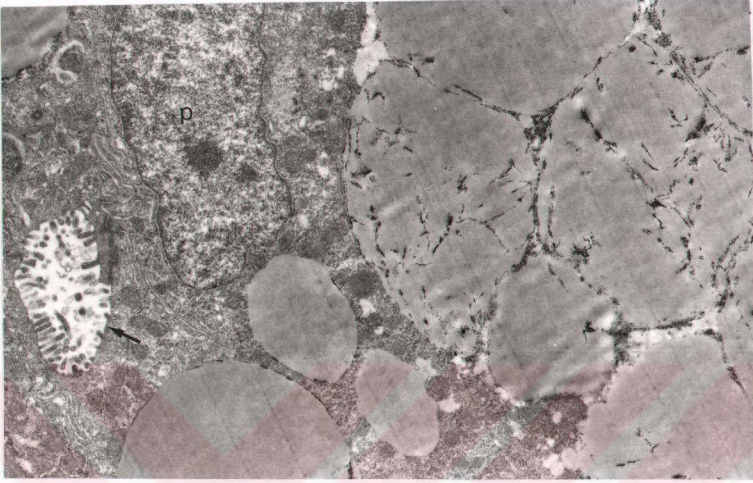
Şekil 18. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonra Kupffer hüresince (k) fagosit edilmiş az sayıdaki latex partikülleri (ok) ile hepatosite (h) ait mitokondriyonların (m) boyutlarındaki küçülme. x 12000.



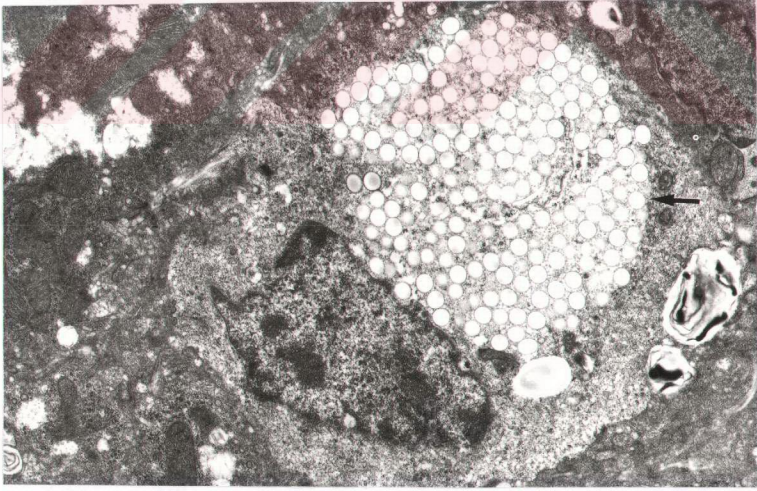
Şekil 19. Kontrol grubu. Hepatositteki granüllü endoplazma retikulumu (oklar). x 22000.



Şekil 20. Deneme grubu. Hepatositin granüllü endoplazma retikulumundaki ribozomlarda yer yer azalma görülmekte (ok). x 22000.



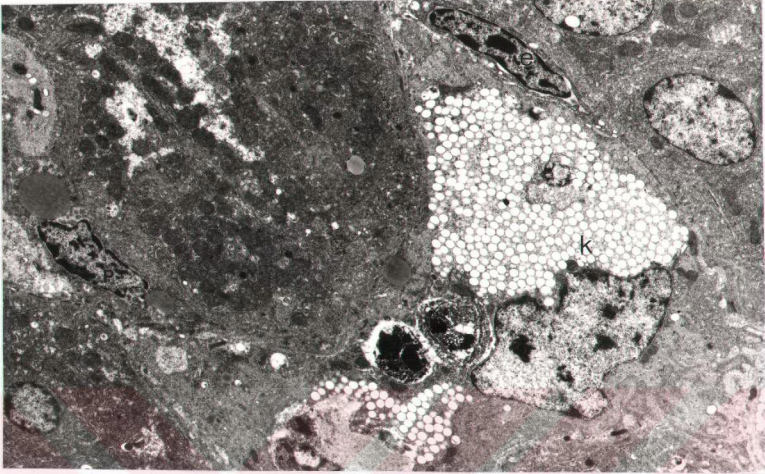
Şekil 21. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenmeden sonraki durum: İnterselüler safra kanalcıklarına ait mikrovillustarda yer yer azalma görülmekte (ok), perisinuzoidal hücre (p). x 12000.



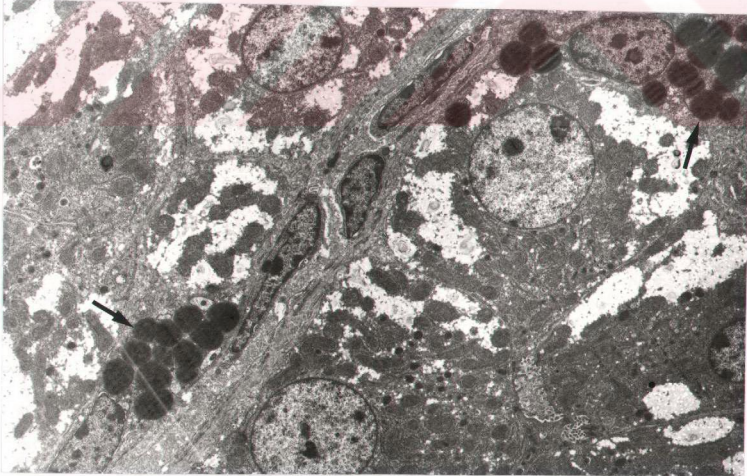
Şekil 22. Kontrol grubu. Kupffer hücresi tarafından fagosite edilmiş çok sayıdaki latex partikülleri (ok). x 11200.

Kupffer hücrelerinin sayıları ve fagositoz oranı büyük ölçüde düşmüştü. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (Şek.22-23), fagosite edilen latex partikülleri sayısının da çarpıcı düzeyde azaldığı görüldü (Şek.18,ok). Gerek kontrol ve gerekse deneme gruplarında, endotel hücrelerinin latex fagositozu yapmadıkları saptandı (Şek.23,e).

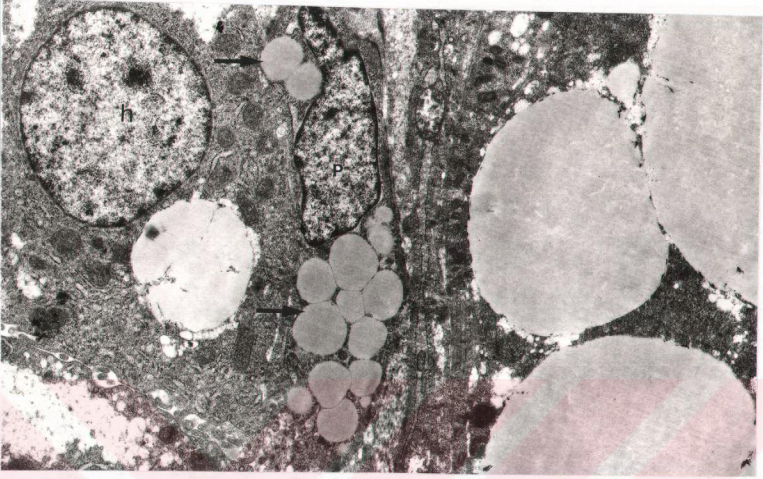
Aflatoksinsiz rasyon verilen ve A vitamini uygulaması yapılmayan kontrol grubundaki civcivlerin karaciğer ince kesitlerinde, sitoplazmalarında bir iki adet lipid damlacığı taşıyan az sayıda perisinuzoidal hücrelere rastlanırken (Şek.23,p), aynı şekilde toksinsiz yem ile beslenen ve kesimden iki hafta önce A vitamini verilen kontrol grubuna ait ince kesitlerde, bu hücrelerin ve içlerindeki lipid damlacıkları sayılarının artmış olduğu görüldü (Şek.24,oklar). Toksinli yemle birlikte kesimden iki hafta önce A vitamini verilenlerde perisinuzoidal hücre sayılarının, toksinsiz yemle beslenen, fakat A vitamini verilmeyen kontrol grubuna göre daha fazla, toksinsiz yemle birlikte yüksek dozda A vitamini verilen kontrol grubuna göre ise daha az sayıda olduğu dikkati çekti. A vitamini ile beraber toksinli (Şek.25,oklar) ve toksinsiz (Şek.24,oklar) yem verilenlerin perisinuzoidal hücre sitoplazmalarında bulunan lipid damlacıklarının sayıları arasında belirgin bir farklılık görülmedi.



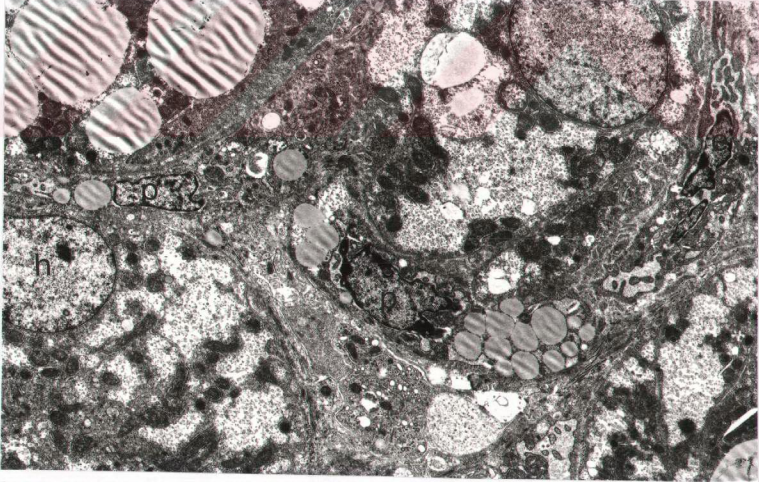
Şekil 23. Kontrol grubu. Kupffer hücresinde (k) fagositoz pozitif, endotel hücresinde (e) fagositoz negatif. Perisinuzoidal hücrede (p) az sayıdaki yağ damlacıkları. x 5800.



Şekil 24. Kontrol grubu. A vitamini verildikten sonra perisinuzoidal hücrelerdeki lipid damlacıkları sayısının arttığı görülmekte (oklar). Altın klorür. x 4000.



Şekil 25. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li yem ile beraber A vitamini verilen hayvanların perisinuzoidal hücrelerindeki lipid damlacıkları (oklar) görülmekte. Perisinuzoidal hücre (p), Hepatosit (h). x 10800.



Şekil 26. Deneme grubu. Aflatoksin B₁'li yemle beslenirken A vitamini verilen civcivlerin perisinuzoidal hücrelerinde (p) daha koyu boyanan yağ damlacıkları. Hepatosit (h), endotel hücre (e). x 5500.

Perisinuzoidal hücrelerdeki lipid damlacıkları, hepatositlerdeki damlacıklardan daha koyu boyanmıştı (Şek.26). Elektron mikroskopik incelemeler sonucunda kontrol ve deneme gruplarının hepsinde hepatositler, altın klorüre negatif reaksiyon gösterdiler. Aynı şekilde endotel ve Kupffer hücrelerinde de vitamin A verilmesiyle ilgili olarak bir değişim dikkati çekmedi ve sitoplazmalarında lipid damlacıklarının bulunmadığı görüldü.



5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer hücreleri, yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü korumada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Organın normal metabolik işlevlerine zarar veren bir çok maddeler, yağ birikimine ve nekrozlara neden olurlar. Karaciğer yağlanması toksik maddeler (24,32,35,36,37,47,57), metabolitler veya beslenme faktörleri (1,5,11,63) gibi çok çeşitli nedenler sonucunda meydana gelebilir. Bu organda lipid birikimine yol açan etiyolojik faktörler geniş bir dağılım göstermelerine rağmen sonuçta, depolanmış olan yağların büyük çoğunluğu trigliseriddir (53). Karaciğer yağlanmasında lipid birikimi, lipidlerin bu organdan plazmaya verilmesinin engellenmesi sonucunda meydana gelir. Aynı zamanda protein sentezinde de bazı aksaklıklar oluşur. Ancak, karaciğer yağlanması ile protein sentezinin inhibisyonu arasında bir neden-sonuç ilişkisi kurulamamıştır (53).

Smith ve Hamilton'a (57) göre lipidler, karaciğerde sentezlendikleri yerden taşınmadığından, aflatoksin alan piliçlerin periferik yağ depoları normal düzeyin altında kalmaktadır. Çalışmamızda karaciğer büyümesi, lipid içeriğinin artmasıyla demonstre edilmiştir. Bu da aflatoksinin lipid metabolizmasını bozduğunu gösterir.

Araştırmacılar, karaciğer relativ ağırlığının lipid birikimine bağlı olarak arttığını (55), organın büyümesi, gevrek görünümü gibi özelliklerinin yağlı karaciğer hastalığı ile broyler aflatoksikozisi arasında bir ilişkinin bulunduğunu bildirmektedirler (57).

Smith ve Hamilton (57) ile Huff ve arkadaşlarına (37) göre, 21.güne ulaşan broylerler üzerindeki bütün parametreler, kanatlı aflatoksikozisinde başlıca hedef organın karaciğer olduğunu

göstermiştir. Maurice ve arkadaşları (43) ile Carnaghan ve arkadaşları (14), ilk üç hafta boyunca hepatositlerde yağ depolanmasının piliçler için çok fazla tehlike yaratmadığını, Hilton ve arkadaşları (35) ise 21.günde lipid damlacıklarının bazı hepatositlerde önemli miktarlara ulaşırken, diğerlerinde hemen hiç görülmediğini ileri sürmüşlerdir. Biz de aynı karaciğer tablosuyla karşılaştık.

Carnaghan ve arkadaşları (14) ile Smith ve Hamilton (57), portal bölgelerdeki hücrelerde yağ değişikliklerinin daha belirgin olduğunu belirtmişlerdir. Klasik öğretilerde de lopçuklara giren kanın, ilk olarak 1.bölgedeki hücrelerle karşılaştığı, toksikasyon olgularında öncelikle karaciğer lopçuklarının 1.bölgesindeki hücrelerin zarar gördüğü vurgulanmıştır (61). Aflatoksinli rasyonla beslenen deneme grubuna ait bütün piliçlerin karaciğer kesitleri ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde, yağlanmanın bu bölgelerde daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

Merkley ve arkadaşları (44), karaciğerde meydana gelen lipid artışının aflatoksine karşı özel bir yanıt değil, organın zararlı etkilere gösterdiği genel tepki biçimi olduğunu belirtmişlerdir.

Hepatositlerde, aflatoksikozise bağlı olarak rastladığımız çok sayıdaki küçük mitokondriyonlar, Deborah ve Butler'in (24) ratlarda, Hilton ve arkadaşlarının (35) piliçlerdeki bulgularına uymaktadır. Olayın, toksikozis sonucu lizozomal enzimlerin aktive edilmesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (64). Bu aktivasyon için enerji gereksiniminin artışı karşılayabilecek düzeyde mitokondriyon çoğalması akla yakın gelmektedir.

Rao (53), membranlar üzerine yıkıcı etkiler gösteren aflatoksinin granüllü endoplazma retikulumundan ribozomları kopardığını bildirmiştir. Elektron mikroskopik incelemelerimizde, Deborah ve Butler'in (24) bildirdikleri gibi, yağlanmaya bağlı olarak hepatositlerin granüllü endoplazma retikulumlarının paralel düzeninde bozulmalara ve bunlara ait ribozom sayılarında azalmalara sıklıkla rastladık. Bu durum, bir çok araştırmacı tarafından protein sentezinin inhibisyonuna atfedilmiştir (24,35,37).

İçlerindeki lipid damlacıkları yüzünden hepatositlerin ve çekirdeklerinin boyutları ile düzeninde farklılıklar saptandı. Elektron mikroskopik büyütmelemede, aflatoksikozise bağlı olarak, hepatosit çekirdeklerinin soluk renkli görünüşleri ve dolayısı ile daha belirgin gözükken çekirdekçikleriyle karşılaşıldı. Deborah ve Butler (24) bu durumun, çekirdeklerin kromatin materyallerini tüketmiş olmalarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar (24) çekirdekte, mitokondriyonlarda ve granüllü endoplazma retikulumlarındaki bu değişiklikleri aflatoksikozis için karakteristik bulduklarını bildirmişlerdir.

Elektron mikroskopik incelemelerimizde, Deborah ve Butler'in (24) interselüler safra kanalıklarına ait mikrovilluslarda gözledikleri sayısal azalma tablosuna sıklıkla rastladık. Portal bölgede, portal venden gelen bol miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu da Bilgiç (10), Smith ve arkadaşları (58) ile Gupta ve arkadaşlarının (31) spesifik olmayan bulgularıyla uygunluk göstermektedir.

Elektron mikroskopik incelemelerimizde, latex enjeksiyonu yapılan kontrol grubuna ait civcivlerin karaciğer endotel hücrelerinde latex fagositozu saptanamamış olması Dan ve Wake'in (23) bulgularıyla

bağdaşmaktadır. Kupffer hücrelerinin ise bu partiküllerin endositozunda çok yüksek kapasiteye sahip oldukları gözlenmiştir (71).

Michael ve arkadaşları (45), aflatoksikozisli piliçlerin infeksiyonlara daha duyarlı hale geldiklerini çünkü, yabancı unsurları kan dolaşımından uzaklaştırma yeteneklerini önemli ölçüde kaybettiklerini ileri sürmüşler, Chang ve Hamilton (15) ile Giambone ve arkadaşları (28), aflatoksikozisin kanatlıları infeksiyöz hastalıklara duyarlı kılmasını hücresele bağışıklığın bazı yönlerini aksatmasına bağlamışlardır. Giambone ve arkadaşları (27), lökositlerin kemotaktik yetenekleri ile fagositoz güçlerini yitirdiklerini, ancak yemlerdeki aflatoksinin immunité üzerine kalıcı etki meydana getirmedigini, bu suretle toksin tarafından yaratılan immunolojik zararın geçici ve sadece aflatoksinli yem tüketimi süresince meydana geldiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada (29), hücresele bağışıklığın azaldığını ve aflatoksinin immuno-depresif etkisinin öncelikle hücresele bağışıklık sistemi üzerine olduğunu vurgulamışlardır. Mohiuddin ve arkadaşları (46), aflatoksinin nötrofil granülositler ve Kupffer hücrelerinin fagositik aktiviteleri üzerine baskılayıcı etki gösterdiğini, total lökosit ve trombosit sayılarını azalttığını, dolayısı ile bu toksinin infeksiyonlara karşı vücut direncini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Aflatoksin B₁ içeren rasyonla beslenirken latex uygulaması yapılan deneme grubuna ait piliçlerin karaciğerlerinin elektron mikroskopisinde, Kupffer hücrelerinin sayılarındaki azalma çok çarpıcı bulunmuştur. Tung ve arkadaşlarının (65) aflatoksikozis olgularında kan dolaşımındaki monositlerin sayıca azaldıklarını gözlemlemiş olmaları, monositlerden köken aldığı kabul edilen Kupffer hücrelerindeki azalmayı açıklayabilir. Yine bu hücrelerin fagositik aktivitelerini büyük ölçüde

kaybettiklerini ve buna bağlı olarak fagosite ettikleri partikül sayısının azaldığını bildiren Tung (65), Michael ve arkadaşları (45), Mohiuddin ve arkadaşları (46) ile Chang ve Hamilton'un (15,17,18) görüşlerine katılmaktayız.

Yukarı sınıf omurgalılar, hücrelerinde A vitamini sentezi yapamadıklarından depolamak zorundadırlar. Karaciğerdeki perisinuzoidal hücrelerin A vitamini depolamasındaki rollerini Aştı (3,6), Aştı ve arkadaşları (4,7), Wake (68,69) ile Blomhoff ve arkadaşları (12) ayrıntılarıyla açıklamışlar, vitamin A metabolizmasında hepatositlerle işbirliği içerisinde çalıştıklarını göstermişlerdir.

Aflatoksin B₁'li rasyonla beslenen ve vitamin A verilmeyen deneme grubundaki hayvanların karaciğerlerinde, aflatoksine bağlı olarak şekillendiği çeşitli araştırmacılar (14,33,36,37) tarafından da bildirilen yağlı karaciğer tablosu bu çalışmada da gözlemlendi. Perisinuzoidal hücrelerin ve bunların sitoplazmalarındaki lipid damlacıklarının sayısında ise bir değişim izlenmedi. Buna karşılık, aflatoksinli rasyonla beslendikten bir hafta sonra yüksek dozda vitamin A verilen ve uygulama periyodunun sonunda kesilen deneme grubundaki hayvanlarda, hepatositlerde aflatoksikozise ait tüm bulgular yanında, perisinuzoidal hücrelerin sitoplazmalarında lipidlerin depolandığı da görüldü. Bulgularımız sonucunda, piliçlerde aflatoksikozis şekillendiğinde hepatositlerde lipid birikiminin arttığı, perisinuzoidal hücrelerin sayısında ise dikkati çekecek düzeyde bir azalmanın meydana geldiği saptandı.

Diğer taraftan, yapılan biyokimyasal analizlerle, perisinuzoidal hücrelerdeki lipid damlacıklarının çoğunun retinil esterleri (34,72), hepatositlerdeki lipid damlacıklarının ise trigliseridler olduğu (44,53)

saptanmıştır. Elektron mikroskopik bulgularımızda, perisinuzoidal hücrelerdeki lipid damlacıklarının karaciğer epitel hücrelerinde bulunanlardan daha koyu boyandığı tespit edilmiş olması nedeniyle, bu yağ damlacıklarının ayrı karakterlerde oldukları biçimindeki görüşü benimsemekteyiz. Moriwaki ve arkadaşlarının (48), perisinuzoidal hücrelerdeki lipid damlacıklarının içerik ve kompozisyonunun yemlerdeki retinoidlerle, hepatositlerdeki lipid damlacıklarının içerik ve kompozisyonunun ise trigliseridlerle düzenlendiğini belirtmiş olmaları, bu hücrelerin farklı görevler üstlendiğini gösterir. Aştı'nın da (3,6) belirttiği gibi, hepatositlerle perisinuzoidal hücrelerin farklı metabolizma olaylarında görev aldıkları fikrine de katılmaktayız.

Sonuç olarak: civcivlerde aflatoksikozisten en fazla etkilenen organın karaciğer olduğunu, kimi hepatositlerin büyük ölçüde yağlandıklarını, bunun sonucu çekirdeklerinin ve hücre membranlarının parçalanarak birbirine komşu durumdaki hücrelere ait yağ kitlelerinin kaynaşmak suretiyle geniş yağ alanları oluşturduklarını, Remark kordonlarındaki bozulmayla birlikte sinuzoidlerin çatısını şekillendiren endotel hücrelerinin de olumsuz biçimde etkilendiklerini, Kupffer hücreleri ve fagosite ettikleri latex partiküllerinin sayılarında çarpıcı düzeyde düşüşler görüldüğünü, perisinuzoidal hücrelerin miktarlarının azalmasına bağlı olarak da karaciğerde A vitamini depolama görevinin gerilediğini söyleyebiliriz.

6. ÖZET

Bu çalışma, yemlerdeki aflatoksin B₁'in civciv karaciğerindeki etkilerini, A vitamini metabolizması ile ilişkilerini ışık-, flüoresan - ve elektron mikroskopik düzeylerde ortaya koymak amacıyla yapıldı.

Araştırma boyunca toplam 30 civciv kullanıldı. Karaciğerde yağların demonstrasyonu için sudan III, sudan black B ve oil red o boyamaları uygulandı. Perisinuzoidal hücrelerin lokalizasyonunu göstermek amacıyla da altın impregnasyonu yapıldı.

Sonuçta, hepatositlerin aşırı yağlanmasıyla ilgili olarak yağ odaklarının meydana geldiği, Remark kordonlarındaki bozulmayla birlikte sinuzoidlerin çatısını oluşturan endotel hücrelerinin olumsuz şekilde etkilendikleri, Kupffer hücreleri sayılarının ve fagositoz yeteneklerinin azaldığı, perisinuzoidal hücrelerinin de sayıca azalmasına bağlı olarak karaciğerin A vitamini depolama görevini aksattığı saptandı.

Anahtar Kelimeler : Civciv, karaciğer, aflatoksin B₁, vitamin A.

7. SUMMARY

LIGHT-, FLUORESCENCE -- AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON LIVER IN CHICKS FED AFLATOXIN B₁

This study was carried out under light, electron and fluorescence microscopy to investigate the effects of aflatoxin B₁ in feeds on chicks' liver and its relation with vitamin A metabolism.

Thirty chicks were used throughout the study. Sudan III, sudan black B and oil red o dyes were used for the demonstration of fats in the liver and gold impregnation was performed to show the perisinusoidal cells' localisation.

Results showed that there were focal areas of fat depending on excess fat accumulation in the hepatocytes, endothelial lining cells which compose the basic structure of sinusoids had negative effects arising from disorganization of liver plates. Kupffer cells were decreased and their phagocytic abilities was reduced. Depending on decrease of perisinusoidal cells, liver was regressed the ability to store vitamin A.

Key Words : Chickens, liver, aflatoxin B₁, vitamin A.

8. KAYNAKLAR

1. AKKILIÇ, M., TANYOLAÇ, A.: Kafeste Beslenen Tavuk Rasyonlarındaki Enerji Düzeyinin Karaciğer Yağlanması Üzerine Etkisi. AÜ Vet. Fak. Derg. Cilt. XX, No : 3-4, 1974.
2. ANDERSEN, K. B., NILSSON, A., BLOMHOFF, H. K., OYEN, T. B., GABRIELSEN, O. S., NORUM, K. R. and BLOMHOFF, R.: Direct Mobilization of Retinol from Hepatic Perisinusoidal Stellate Cells to Plasma. J. Biol. Chem. 267:1340-1344, 1992.
3. AŞTI, R. N.: Kanatlılarda Perisinuzoidal Hücrelerin (Fat Storing Cell) Varlığı, Bunların Vitamin A ve Lipid Metabolizması ile İlişkisi Üzerinde Işık-, Elektron ve Fluoresan Mikroskopik Çalışmalar. Doçentlik Tezi. AÜ Vet. Fak. Hist. Emb. Bilim Dalı. Ankara, 1982.
4. AŞTI, R. N., ÖZCAN, Z., ÇELİK, İ. ve ÇINAR, K.: Vitamin A'nın Sığır Karaciğerinde Hücrel Depolanması. SÜ Vet. Fak. Derg. 2:53-64, 1986.
5. AŞTI, R. N., TUNCER, Ş. D., KALAYCIOĞLU, L., COŞKUN, B., BAŞPINAR, N. ve ÇELİK, İ.: Broyerlerde Yağlı Karaciğer Sendromu Üzerinde Histolojik ve Biyokimyasal Çalışmalar. SÜ Vet. Fak. Derg. 3:233-246, 1987.
6. AŞTI, R. N.: Kanatlı Karaciğerindeki Perisinuzoidal Hücrelerin A Vitaminini, Lipid Metabolizması, Yağlı Karaciğer Hastalığı ile İlişkisi Üzerinde Işık ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. SÜ Vet. Fak. Derg. 6:7-12, 1990.
7. AŞTI, R. N., SAĞLAM, M., TANYOLAÇ, A., KURTDEDE, N. ve ERGÜN, L.: Vitamin A'nın Tavuk Karaciğerinde Hücrel Depolanması. AÜ Vet. Fak. Derg. 41'de yayınlanmak üzere baskıda.
8. AYKAÇ, İ.: Histolojik ve Histoşimik Boya Teknikleri Ders Kitabı. Atatürk Üniv. Tıp Fak. Yayınları, No: 26, Ders Kitabı :203, 1977.
9. BASSIR, O., ADEKUNLE, A. A. and OKOYE, Z. S. C.: Effect of Vitamin A Deficiency and Excess on Aflatoxin Metabolism in the Rabbit. Biochem. Pharmacol. 27:833-838, 1978.
10. BİLGİÇ, H. N.: Cıvcivlerde Deneysel Aflatoksikozis Olaylarında Patolojik Bulgular. Doktora tezi, İÜ Sağ. Bil. Enst. Patoloji ABD. İstanbul, 1991.
11. BLAIR, R., WHITEHEAD, C. C., BANNISTER, D. W. and EVANS, A. J.: Involvement of Diet in Fatty Liver and Kidney Syndrome in Broiler Chickens. Vet. Rec. 92:118-119, 1973.
12. BLOMHOFF, R., GREEN, M. H., GREEN, J. B., BERG, T. and NORUM, K. R.: Vitamin A Metabolism : New Perspectives on Absorption, Transport, and Storage. Physiol. Rev. 71:951-990, 1991.
13. BRYDEN, W. L., CUMMING, R. B. and BALNAVE, D.: The Influence of Vitamin A Status on the Response of Chickens to Aflatoxin B₁ and Changes in Liver Lipid Metabolism Associated with Aflatoxicosis. Br. J. Nutr. 41:529-540, 1979.
14. CARNAGHAN, R. B. A., LEWIS, G., PATTERSON, D. S. P. and ALLCROFT, R.: Biochemical and Pathological Aspects of Groundnut Poisoning in Chickens. Pathol. Vet. 3:601-615, 1966.

15. CHANG, C.F. and HAMILTON, P.B.: Altered Phagocytosis during Aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 55:2018, 1976.
16. CHANG, C.F. and HAMILTON, P.B.: Impaired Phagocytosis by Heterophils from Chickens during Aflatoxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48:459-466, 1979.
17. CHANG, C.F. and HAMILTON, P.B.: Refractory Phagocytosis by Chicken Trombocytes during Aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 58:559-561, 1979.
18. CHANG, C.F. and HAMILTON, P.B.: Impairment of Phagocytosis in Chicken Monocytes during Aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 58:562-566, 1979.
19. CHEN, C., PEARSON, A.M., COLEMAN, T.H., GRAY, J.I., PESTKA, J.J. and AUST, S.D.: Tissue Deposition and Clearance of Aflatoxins from Broiler Chickens Fed a Contaminated Diet. *Fd. Chem. Toxic.* 22:447-451, 1984.
20. CH'IH, J.J. and DEVLIN, T.M.: The Distribution and Intracellular Translocation of Aflatoxin B₁ in Isolated Hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1-8, 1984.
21. CH'IH, J.J., EWASKIEWICZ, J.I., TAGGART, P. and DEVLIN, T.M.: Nuclear Translocation of Aflatoxin B₁-Protein Complex. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 190:186-191, 1993.
22. DALVI, R.R. and ADEMOYERO, A.A.: Toxic Effects of Aflatoxin B₁ in Chickens Given Feed Contaminated with *Aspergillus flavus* and Reduction of the Toxicity by Activated Charcoal and Some Chemical Agents. *Avian Dis.* 28:61-69, 1984.
23. DAN, C. and WAKE, K.: Modes of Endocytosis of Latex Particles in Sinusoidal Endothelial and Kupffer Cells of Normal and Perfused Rat Liver. *Exp. Cell Res.* 158:75-85, 1985.
24. DEBORAH, J.P. and BUTLER, W.H.: The Ultrastructural Features of Aflatoxin B₁-Induced Lesions in the Rat Liver. *Br. J. Exp. Pathol.* 69:793-804, 1988.
25. DONALDSON, W.E., TUNG, H.T. and HAMILTON, P.B.: Depression of Fatty Acid Synthesis in Chick Liver (*Gallus Domesticus*) by Aflatoxin. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B:843-847, 1972.
26. FIROZI, P.F., ABOOBAKER, V.S. and BHATTACHARYA, R.K.: Action of Vitamin A on DNA Adduct Formation by Aflatoxin B₁ in a Microsome Catalyzed Reaction. *Cancer Lett.* 34:213-220, 1987.
27. GIAMBRONE, J.J., EWERT, D.L., WYATT, R.D. and EIDSON, C.S.: Effect of Aflatoxin on the Humoral and Cell-Mediated Immune Systems of the Chicken. *Am. J. Vet. Res.* 39:305-308, 1978.
28. GIAMBRONE, J.J., DIENER, U.L., DAVIS, N.D., PANANGALA, V.S. and HOERR, F.J.: Effects of Purified Aflatoxin on Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 64:852-858, 1985.
29. GIAMBRONE, J.J., DIENER, U.L., DAVIS, N.D., PANANGALA, V.S. and HOER, F.J.: Effects of Aflatoxin on Young Turkeys and Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 64:1678-1684, 1985.

30. GREEN, M.H., GREEN, J.B., BERG, T., NORUM, K.R. and BLOMHOFF, R.: Changes in Hepatic Parenchymal and Nonparenchymal Cell Vitamin A Content during Vitamin A Depletion in the Rat. *J.Nutr.* 118:1331-1335, 1988.
31. GUPTA, R.K.P., BHATIA, K.C., RAM, G.C. and SINGH, J.: A Report of Aflatoxicosis in Poultry. *Indian Vet.J.* 62:203-208, 1985.
32. HAMILTON, P.B. and GARLICH, J.D.: Aflatoxin as a Possible Cause of Fatty Liver Syndrome in Laying Hens. *Poult.Sci.* 50:800-804, 1971.
33. HARDING, J.D.J., DONE, J.T., LEWIS, G. and ALLCROFT, R.: Experimental Groundnut Poisoning in Pigs. *Res.Vet.Sci.* 4:217-229, 1963.
34. HENDRIKS, H.F.J., BROUWER, A., KNOOK, D.L.: The Role of Hepatic Fat-Storing (Stellate) Cells in Retinoid Metabolism. *Hepatology.* 7:1368-1371, 1987.
35. HILTON, H.M., DONALD, E.C., WILLIAM, E.H., LEON, F.K., ROGER, B.H. and ROBERT, E.D.: Ultrastructure of Hepatic and Renal Lesions in Chickens Fed Aflatoxin. *Am.J.Vet.Res.* 50:771-777, 1989.
36. HUFF, W.E., KUBENA, L.F., HARVEY, R.B., CORRIER, D.E. and MOLLENHAUER, H.H.: Onset of Aflatoxicosis in Broiler Chickens. *Poult.Sci.* 65 (Suppl.1) :60, 1986.
37. HUFF, W.E., KUBENA, L.F., HARVEY, R.B., CORRIER, D.E. and MOLLENHAUER, H.H.: Progression of Aflatoxicosis in Broiler Chickens. *Poult.Sci.* 65:1891-1899, 1986.
38. KARNOVSKY, M.J.: Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *J.Cell Biol.* 27:137A-138A, 1965.
39. KUDO, S.: The Morphology of Release of Vitamin A-Containing Lipid Droplets by Hepatocytes in Rat Liver. *Anat.Rec.* 225:11-20, 1989.
40. LINDBERG, L.A. and GRÖHN, Y.: Structure and Occurrence of Perisinusoidal Stellate Cells in the Liver of Lactating Dairy Cows. *Acta Anat.* 126:127-131, 1986.
41. MAHER, J.J.: Fat-Storing Cells and Myofibroblasts: One Cell or Two. *Hepatology.* 9:903-904, 1989.
42. MASHALY, R.I., SALEM, M.H., MAHMOUD, Z.H., EL-DEEB, S.A., EL-SHAARAWI, G. and ISMAIL, A.A.: Effect of Aflatoxins on Body-Weight Gains, and on Protein and RNA Synthesis in Chickens. *Indian J.Anim. Sci.* 56:698-702, 1986.
43. MAURICE, D.V., BODINE, A.B. and REHRER, N.J.: Metabolic Effects of Low Aflatoxin B₁ Levels on Broiler Chicks. *Appl.Environ.Microbiol.* 45:980-984, 1983.
44. MERKLEY, J.W., MAXWELL, R.J., PHILLIPS, J.G., and HUFF, W.E.: Hepatic Fatty Acid Profiles in Aflatoxin-Exposed Broiler Chickens. *Poult.Sci.* 66:59-67, 1987.
45. MICHAEL, G.Y., THAXTON, P. and HAMILTON, P.B.: Impairment of the Reticuloendothelial System of Chickens During Aflatoxicosis. *Poult.Sci.* 52:1206-1207, 1973.

46. MOHIUDDIN, S.M., REDDY, M.V., REDDY, M.M. and RAMAKRISHNA, K.: Studies on Phagocytic Activity and Haematological Changes in Aflatoxicosis in Poultry. *Indian Vet. J.* 63:442-445, 1986.
47. MOORTHY, A.S., MAHENDAR, M. and RAO, P.R.: Hepatopathology in Experimental Aflatoxicosis in Chickens. *Indian J. Anim. Sci.* 55:629-632, 1985.
48. MORIWAKI, H., BLANER, W.S., PIANTEDOSI, R. and GOODMAN, D.S.: Effects of Dietary Retinoid and Triglyceride on the Lipid Composition of Rat Liver Stellate Cells and Stellate Cell Lipid Droplets. *J. Lipid Res.* 29:1523-1534, 1988.
49. MUTO, Y., SMITH, J.E., MILCH, P.O., GOODMAN, D.S.: Regulation of Retinol-binding Protein Metabolism by Vitamin A Status in the Rat. *J. Biol. Chem.* 247:2542-2550, 1972.
50. NIZAMOĞLU, M., ASLAN, V., AŞTI, R.N., ve EREN, Ü.: Yağlı Karaciğer Sendromlu Süt Sığırlarında Vitamin A ve E Değerlerinin Araştırılması. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 18:293-298, 1994.
51. NOY, N. and BLANER, W.S.: Interaction of Retinol with Binding Proteins: Studies with Rat Cellular Retinol-binding Protein and with Rat Retinol-binding Protein. *Biochem.* 30:6380-6386, 1991.
52. PETERSON, P.A., RASK, L., ÖSTBERG, L., ANDERSSON, L., KAMWENDO, F. and PERTOFT, H.: Studies on the Transport and Cellular Distribution of Vitamin A in Normal and Vitamin A-deficient Rats with Special Reference to the Vitamin A-binding Plasma Protein. *J. Biol. Chem.* 248:4009-4022, 1973.
53. RAO, K.S.: Aflatoxin B₁ Induced Inhibition of Liver Protein Synthesis In Vivo and Its Role in Fatty Liver. *Biochem. Pharmacol.* 20:2825-2831, 1971.
54. ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik.* Urban und Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 1989.
55. SCHROEDER, E.C., NAIR, K.P.C. and CARDEILHAC, P.T.: Response of Broiler Chicks to a Single Dose of Aflatoxin. *Poult. Sci.* 51:1552-1556, 1972.
56. SOPRANO, D.R., SOPRANO, K.J. and GOODMAN, D.S.: Retinol-binding Protein Messenger RNA Levels in the Liver and in Extrahepatic Tissues of the Rat. *J. Lipid Res.* 27:166-171, 1986.
57. SMITH, J.W. and HAMILTON, P.B.: Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. *Poult. Sci.* 49:207-215, 1970.
58. SMITH, J.A., ADEKUNLE, A.A. and BASSIR, O.: Comparative Histopathological Effects of Aflatoxin B₁ and Palmotoxins B₀ and G₀ on Some Organs of Different Strains of the Newly Hatched Chick (*Gallus Domesticus*). *Toxicology*, 3:177-185, 1975.
59. STEWART, R.G., SKEELES, J.K., WYATT, R.D., BROWN, J., PAGE, R.K., RUSSELL, I.D. and LUKERT, P.D.: The Effect of Aflatoxin on Complement Activity in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 64:616-619, 1985.
60. ŞANLI, Y., YAVUZ, H. ve AKAR, F.: Kuru İncir Örneklerinde Mikotoksin Kirlilikleri *AÜ Vet. Fak. Derg.* 37:293-308, 1990.
61. TANYOLAÇ, A.: Özel Histoloji. *AÜ Vet. Fak.* Ankara, 1993.

62. THAXTON, J.P., TUNG, H.T. and HAMILTON, P.B.: Immunosuppression in Chickens by Aflatoxin. *Poult. Sci.* 53:721-725, 1974.
63. TUNCER, Ş.D., AŞTI, R., COŞKUN, B., ERER, H. ve TEKEŞ, M.A.: Farklı Enerji Kaynaklarının Broylarlerde Besi Performansı, Abdominal Yağ Birikimi ve Karaciğer Yağlanması Üzerine Etkisi. II. Karaciğer Yağlanmasına Etkisi. *SÜ Vet. Fak. Derg.* 3:41-62, 1987.
64. TUNG, H.T., DONALDSON, W.E. and HAMILTON, P.B.: Effects of Aflatoxin on Some Marker Enzymes of Lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 222:665-667, 1970.
65. TUNG, H.T., COOK, F.W., WYATT, R.D. and HAMILTON, P.B.: The Anemia Caused by Aflatoxin. *Poult. Sci.* 54:1962-1969, 1975.
66. TUNG, H.T., WYATT, R.D., THAXTON, P. and HAMILTON, P.B.: Concentrations of Serum Proteins during Aflatoxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34:320-326, 1975.
67. VENABLE, J.H., and COGGESHALL, R.: A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408, 1965.
68. WAKE, K.: "Sternzellen" in the Liver: Perisinusoidal Cells with Special Reference to Storage of Vitamin A. *Am. J. Anat.* 132:429-461, 1971.
69. WAKE, K.: Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and Around the Livers Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs. *Int. Rev. Cytol.* 66:303-353, 1980.
70. WAKE, K., MOTOMATSU, K., SENOO, H., MASUDA, A. and ADACHI, E.: Improved Kupffer's Gold Chloride Method for Demonstrating the Stellate Cells Storing Retinol (Vitamin A) in the Liver and Extrahepatic organs of Vertebrates. *Stain Tech.* 61:193-200, 1986.
71. WIDMANN, J.J., COTRAN, R.S. and FAHIMI, H.D.: Mononuclear Phagocytes (Kupffer Cells) and Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* 52:159-170, 1972.
72. YAMADA, M., BLANER, W.S., SOPRANO, D.R., DIXON, J.L., KJELDBYE, H.M. and GOODMAN, D.S.: Biochemical Characteristics of Isolated Rat Liver Stellate Cells. *Hepatology.* 7:1224-1229, 1987.
73. YU, F.L., GERONIMO, I.H., BENDER, W. and PERMTHAMSI, J.: Correlation Studies Between the Binding of Aflatoxin B₁ to Chromatin Component and the Inhibition of RNA Synthesis. *Carcinogenesis.* 9:527-532, 1988.

9. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.Attila TANYOLAÇ'a, ayrıca çalışmanın belirli dönemlerindeki öneri ve katkılarıyla beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof.Dr.Reşat Nuri AŞTI ile Anabilim Dalı'mızdaki diğer hocalarıma ve tüm çalışma arkadaşlarıma, aflatoksinin kullanımında ve doz ayarlamalarında metod ve ölçüm işlerindeki yardımlarından ötürü Sayın Prof.Dr.Yusuf Şanlı'ya, bu araştırmanın projelendirilmesini sağlayan ve maddi destekte bulunan Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Kurumu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

1963 İstanbul doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul, Eskişehir ve Ankara illerinde tamamladım. 1982 yılında öğrenime başladığım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1987 yılında mezun oldum. 1987-1989 yılları arasında yedek subaylık görevimi tamamladım. Entegre tavukçuluk yapan özel bir şirkette saha veterineri olarak 6 ay çalıştıktan sonra, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı'nda açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak 1989 yılı sonunda bu kadroya atandım. Halen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Evliyim.