

## YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B1'İN TAVUK DALAĞININ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ: HİSTOLOJİK BULGULAR\*

Emrah Sur<sup>1</sup>@

İlhami Çelik<sup>1</sup>

### Effects of in Ovo Administrated Aflatoxin B1 on the Embryonic Development of Chicken Spleen: Histological Results

**Özet:** Bu çalışmada, yumurtaya verilen aflatoksin B1 (AFB<sub>1</sub>)'in, tavuk dalağının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik yöntemlerle araştırıldı. Toplam 651 adet yumurta kontrol-1, kontrol-2, %30'luk etil alkol (ETOH), 5 ng/yumurta AFB<sub>1</sub>, 10 ng/yumurta AFB<sub>1</sub>, 20 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> ve 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> olmak üzere toplam 7 gruba ayrıldı. Test solüsyonları hava kamarası yoluyla ve inkübasyon öncesi enjekte edildi. İnkübasyonun 12, 13, 15 ve 18. günleri ile kuluçkadan çıkışın ilk gününde her gruptaki 6'şar hayvandan alınan dalak dokusu örnekleri %10'luk tamponlu formal salinde tespit edildi. Takiben, rutin histolojik tekniklerle takipleri yapılarak parafinde bloklandılar. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler üçlü boyama, retiküler iplik boyası ve Pappenheim'in panoptik boyama yöntemleriyle boyandı. Işık mikroskopik incelemelerde, farklı dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda dalağın embriyonik gelişiminin, kontrollerden geri kaldığı, özellikle de beyaz pulpanın gelişiminin belirgin biçimde baskılanmış olduğu dikkati çekti. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 5 ve 10 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> gruplarına ait civcivlerin dalaklarının tam olarak gelişmemiş olduğu görüldü. Yumurtada bulunan AFB<sub>1</sub>'in, kanatlı lenfoid sisteminde çok önemli rolleri olan dalağın embriyonik gelişimini önemli derecede baskıladığı sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Tavuk Dalağı, Embriyonik Gelişim, Aflatoksin B<sub>1</sub>

**Summary:** In this study, the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), in ovo administrated, on the embryonic development of chicken spleen was evaluated. For this purpose, 651 laying hen's eggs were divided into 7 groups. These groups were designed as control-1, control-2, 30% ethyl alcohol (ETOH), 5 ng/egg AFB<sub>1</sub>, 10 ng/egg AFB<sub>1</sub>, 20 ng/egg AFB<sub>1</sub> and 40 ng/egg AFB<sub>1</sub>. Test solutions were injected via the air sac at pre-incubation period. Six eggs from each groups were opened at 12<sup>nd</sup>, 13<sup>rd</sup>, 15<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days of incubation. At these periods and at the day of hatching, splenic tissue samples from were collected and processed for routine histological techniques. Light microscopic investigations of the tissue preparations have revealed that embryonic development of the chicken spleen was substantially impaired and, white pulp regressed when compared those of the controls. At the day of hatching, development of spleen taken from 5 and 10 ng/egg AFB<sub>1</sub> groups was incomplete. It was concluded that small amounts of AFB<sub>1</sub> found in fertilised avian egg has detrimental effects on the embryonic development of chicken spleen.

**Key Words:** Chicken Spleen, Embryonic Development, Aflatoxin B<sub>1</sub>

### Giriş

Uygun olmayan koşullarda depolanan yem ham maddeleri ile yemlerde üreyen küflerin metabolitleri olan mikotoksinler, tavukçuluk sektöründe yemlerden kaynaklanan önemli sorunlara yol açmaktadırlar. Bunlardan aflatoksinler en sık ve fazla karşılaşılan mikotoksinlerdir. Aflatoksinler içerisinde de aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) saha şartlarında en sık izole edilen ve toksik etkisi en güçlü olan toksindir (Leeson ve ark., 1995; Oğuz, 1997).

Yemlerde bulunan mikotoksinler belli oranlarda hayvansal ürünlere de geçtiklerinden, insan sağlığına da tehdit etmektedirler. Yumurtaya geçiş oranının 1/

2200-1/2500 arasında olduğu bildirilmektedir (Hamilton, 1982; Çelik ve ark., 2000a). Yumurtaya geçen mikotoksinlerden özellikle AFB<sub>1</sub>, güçlü embriyotoksik etkisi nedeniyle kuluçka randımanını düşürmektedir. (Çelik ve ark., 2000a). Aflatoksinlerin tavuk embriyoları üzerindeki toksik etkileri üzerinde yapılan çalışma sonuçları, AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksik etkisinin doza bağımlı arttığını göstermektedir (Cilievici ve ark., 1980; Çelik ve ark., 2000a). Öte yandan embriyonik dönemde maruz kalınan AFB<sub>1</sub>, merkezi lenfoid organların embriyonik gelişimini de baskılamakta ve bu durum kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde hayvanların hücrel ve humoral immün yanıtlarında önemli yetmezliklerin ortaya çıkışıyla sonuçlanmaktadır (Dietert ve ark., 1985;

Geliş Tarihi : 14.08.2003 @: emrahsur@selcuk.edu.tr

\* Bu çalışma "Yumurtaya Verilen Aflatoksin B1 (AFB<sub>1</sub>)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması" isimli Doktora Tezinin bir bölümüdür.

1. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, KONYA

Neldon-Ortiz ve Qureshi, 1992b; Çelik ve ark., 2000a; 2000b). Böyle hayvanlar, düzenli aşılama programlarına uyularak aşılanmalar dahi etkili ve yeterli bir bağışıklık oluşturamadıklarından, hastalık etkenlerine karşı daha duyarlı hale gelmektedirler (Özer ve ark., 1989; Gabal ve Azzam, 1998; Çelik ve ark., 2000a; 2000b).

Lenfoid organların en büyüğü olan ve yaşam boyu varlığını sürdüren dalak; timus, bursa Fabricii ve memelilerde kemik iliği gibi primer lenfoid organlarda bulunarak kana geçen T- ve B-lenfositlerinin gelip yerleştiği bir sekonder lenfoid organdır. Fötal hayat boyunca kan hücrelerinin yapımını da üstlenir. Dalakta eritrosit ve granülositer lökosit yapımı, kuluçkadan çıkışı takiben sona erer. Organın fonksiyonel üniteleri lenf folikülleri ve lenfatik kordonların oluşturduğu "beyaz pulpa" ile kırmızı pulpa alanları ve venöz sinuslardan oluşan "kırmızı pulpa"dır (Kelly ve ark., 1984). Tavuklarda lenf yumrularının iyi gelişmemiş olmaları ve sadece servikal, torakal ve lumbal bölgelerde bulunmaları (Nickel ve ark., 1977), dalağın tavuk immün sistemindeki rolünü artırmaktadır. Bu yüzden dalağın embriyonik gelişiminde meydana gelebilecek aksaklıklar, kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemlerde hayvanın gerek hücrel ve gerekse humoral bağışıklık fonksiyonlarında önemli yetmezliklerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir (Kelly ve ark., 1984).

Embriyonik dönemde dalak taslağındaki lenf folikülleri ve lenfatik kordonların histolojik gelişimi, arteriya coeliaca'dan gelen kan damarlarının organ taslağına infiltrat olmaları ve yaygın bir damar ağı şekillendirmeleriyle başlamaktadır (Maskar, 1976; Kelly ve ark., 1984; Latshaw, 1987). Dalağın embriyonik gelişimi sırasında, lenfoid hücrelerin organ taslağında en erken kan damarlarının nüfuz etmesinden sonra görülmesi bu durumu kanıtlamaktadır (Latshaw, 1987). Organın stromasını mezenseyal dokudan gelişen retiküler bağ dokusu ve düz kaslar oluştururken; beyaz pulpasındaki lenfatik kordonlarla lenf foliküllerini, timus ve bursa Fabricii'den kan yoluyla buraya gelen T- ve B-lenfositleri oluşturmaktadır (Maskar, 1976; Kelly ve ark., 1984; Latshaw, 1987). T- ve B-lenfositlerin dalağa ve diğer perifer lenfoid organlara göçleri karnivorlarda gebeliğin 40-48. günlerinde, atlarda ise 120. gününde başlamaktadır. Tavuk embriyosunda ise B-lenfositlerin bursa Fabricii'den dalağa göçleri kuluçkanın on dördüncü gününde başlamaktadır (Kocaöz ve ark., 1997). Timusun embriyonik gelişimi üzerinde yapılan bir çalışmada (Sandıkçı ve Çelik, 2000), organın medullasında, tipik lenfosit morfolojisine sahip hücrelere kuluçkanın 10. gününde rastlanmıştır. Olgun T-lenfositlerine özgü bir enzim olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozitifitesi ise kuluçkanın 13. gününde, timus medullasındaki lenfositlerde ortaya çıkmaktadır.

Timustan perifer lenfoid organlara T-lenfosit göçü de muhtemelen bu dönemde başlamaktadır.

Kan dolaşımı ile dalağa gelen lenfositler, organa özgü lenf foliküllerinin çatısını oluşturan retiküler iplik ağının perifer bölgelerine daha fazla yerleşme eğilimi gösterirler. Bu yüzden, histolojik kesitlerde foliküllerin merkezi bölgeleri hücreden fakir ve soluk boyanırlar. Antijenik uyarımlara karşı oluşan yanıtın erken dönemlerinde, buradaki hücreler hızla çoğaldıklarından, bu bölgeler "germinal merkezler" yada "reaksiyon merkezleri" adlarıyla da anılırlar (Kelly ve ark., 1984). Lenf foliküllerinin; germinal merkezleri çevreleyen, hücreden zengin ve koyu boyanan bölgeleri folikül korteksi olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda germinal merkezlerin B-lenfosit bölgeleri, korteksin ve özellikle de periarteriyolar lenfoid kılıfların (PALS), T-lenfosit bölgeleri (Kelly ve ark., 1984; Khan ve ark., 1998)) oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, yumurtaya verilen AFB<sub>1</sub>'in, dalağın beyaz pulpasının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

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 damızlık yumurta kullanıldı.

Test solüsyonlarının hazırlanması: Bu amaçla, kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) standardı (Makor Chemical, Co., Jerussalem, İsrail) kullanıldı.

Kristalize haldeki saf AFB<sub>1</sub> standardı, 20 µg/ml konsantrasyonunda (w/v) AFB<sub>1</sub> içerecek şekilde benzende çözülürerek AFB<sub>1</sub> stok solüsyonu hazırlandı. Ardından, bu solüsyondan çalışmada kullanılacak her bir konsantrasyon grubu için gerekli olan dozlarda AFB<sub>1</sub> içeren miktarlardaki stok solüsyon steril tüplere aktararak karanlıkta bekletildi ve benzenin tamamen uçması sağlandı. Bu işlemi takiben AFB<sub>1</sub> içeren tüplere önceden belirlenen miktarlarda %99,9'luk etil alkol (ETOH) ilave edilerek AFB<sub>1</sub> tamamen eritildi. Daha sonra ETOH konsantrasyonunu %30'a düşürmek amacıyla solüsyonlara steril bidistile su ilave edilerek, 20 ml'sinde istenen miktarda AFB<sub>1</sub> içeren test solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların arzu edilen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içerip içermedikleri ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) ve Floresans Spektrofotometre (Perkin Elmer MPF 43A, emisyon 425 nm, eksitasyon 365 nm dalga boyunda) ile kontrol edildi. Steril tüplere alınan solüsyonlar kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4°C'de) muhafaza edildi.

Deney gruplarının oluşturulması ve test solüsyonlarının yumurtalara enjeksiyonu: Bu çalışmada kullanılan 651 yumurta, enjekte edilen AFB<sub>1</sub> dozları ve içerdikleri yumurta sayıları Tablo 1'de verilen 7 gruba ayrıldı. Solvent-kontrol grubundaki yumurtalara 20 µl %30 ETOH enjekte edilirken, deney gruplarındaki yumurtalara aynı hacimde ve istenen dozda AFB<sub>1</sub> içeren test solüsyonları enjekte edildi.

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar		Uygulanan işlem
Kontrol,	n=86	İşlem uygulanmadı.
Delinip-kapatılan,	n=80	Delinip kapatıldı.
Solvent-kontrol,	n=83	%30 ETOH solüsyonu enjeksiyonu yapıldı.
5 ng AFB <sub>1</sub> ,	n=88	5 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu yapıldı.
10 ng AFB <sub>1</sub> ,	n=97	10 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu yapıldı.
20 ng AFB <sub>1</sub> ,	n=97	20 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu yapıldı.
40 ng AFB <sub>1</sub> ,	n=120	40 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu yapıldı.

Hazırlanan test solüsyonları, yumurtaların, %96'lık ETOH ile dezenfekte edilen küt uçlarında özel yumurta delicisi ile açılan delikten steril uçlu bir mikro pipet (Selpette, Jencons, Finland) kullanılarak hava kamerasına enjekte edildi. Enjeksiyonu takiben, açılan delik derhal sıvı parafinle kapatıldı.

Bu işlemlerin ardından yumurtalar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin Deneme Ünitesindeki 16.000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Söktav), optimal koşullarda (37,8 °C sıcaklık, %65 nisbi nem ve 2 saatte bir çevirme) inkübe edildiler.

Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması: Bu amaçla kuluçkanın 12, 13, 15 ve 18. günlerinde, her gruptan rast gele seçilen 6'şar yumurta açıldı. Deney gruplarından 20 ve 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> gruplarındaki yumurtalardan civciv çıkışı olmadığından, bu gruplardan kuluçkadan çıkıştan sonraki ilk günde dalak dokusu örnekleri alınamadı. Diğer gruplardan ise kuluçkadan çıkışın ilk gününde 6'şar hayvandan dalak dokusu örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formolde tespit edilerek, rutin histolojik metotlarla takipleri yapıldı ve parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitlere Crossman'ın üçlü boyaması (Culling ve ark., 1985), Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyaması (Bradbury ve Gordon, 1990) ile Pappenheim'in panoptik boyaması (Konuk, 1981) uygulandı.

Hazırlanan preparatlar Leitz Laborlux-12 model araştırma mikroskopunda incelenerek, gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları Leitz Ortholux-II model araştırma mikroskopuyla çekildi.

## Bulgular

Dalağın normal embriyonik gelişiminin izlendiği kontrol grubu, delinip-kapatılan grup ve solvent-kontrol gruplarının dalak taslaklarında kuluçkanın on ikinci gününde; çok sayıda hemopoietik odağa ve küçük çaplı arterlerin tunika adventisya katmanlarına infiltre olan az sayıdaki lenfositte rastlandı (Şekil 1). Kuluçkanın on üçüncü gününde ise arterlerin tunika adventisya katmanlarına lenfositlerin infiltrasyonu (Şekil 2) başlayan beyaz pulpa gelişiminin, on ikinci günden daha ileri aşamada olduğu gözlemlendi (Şekil 3). Kuluçkanın on beşinci gününde dalaktaki lenf folikülü gelişimi önceki dönemle karşılaştırıldığında daha da ilerlemiş durumdaydı. On sekizinci günde, kırmızı ve beyaz pulpa alanlarının belirginleştiği (Şekil 4), retiküler ipliklerden zengin olan stromanın oldukça gelişmiş durumda olduğu tespit edildi (Şekil 5). Kuluçkadan çıkışın ilk gününde alınan dalak kesitleri üzerinde yapılan incelemede; dalağın histolojik gelişiminin tamamlanmış olduğu ve organa özgü lenf foliküllerinin merkezi bölgelerinde germinal merkezlerin şekillenmiş oldukları dikkati çekti (Şekil 6).

Kuluçkanın on ikinci gününde, deney gruplarının dalak taslaklarında ise lenf folikülü gelişiminin basılanmış olduğu ve artan dozla birlikte organ taslağında daha az sayıda hemopoietik odağın şekillendiği, küçük çaplı arterlerin tunika adventisya katmanlarındaki lenfositlerin az sayıda oldukları ve ileride venöz sinusları oluşturacak olan venöz damar ağlarının da daha az gelişmiş durumda oldukları tespit edildi (Şekil 7). Kuluçkanın on üçüncü gününde ise özellikle 20 ve 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> gruplarında, lenfatik kordonlarla lenf foliküllerinin gelişimi önemli derecede geri kalmış durumdaydı (Şekil 8). Kuluçkanın on beşinci günü ile on sekizinci günlerindeki bulgular on üçüncü günde kiyle büyük benzerlik göstermekteydi (Şekil 9). Kuluçkadan çıkışın ilk gününde ise deney gruplarından 5 ve 10 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> gruplarının dalak kesitlerindeki lenf foliküllerinin; kontrol grubu, delinip-kapatılan grup ve solvent-kontrol gruplarındakilerden oldukça küçük oldukları ve germinal merkezlerinin şekillenmediği, lenfatik kordonlardaki lenfoid hücre yoğunluğunun daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 10).

## Tartışma ve Sonuç

Gerek yedirme denemeleri ve gerekse tarama çalışmaları, yemlerle alınan aflatoksinlerin, kanatlı do-kularına ve yumurtaya belirli oranlarda geçtiklerini (Jacobson ve Wiseman, 1974; Sudhakar, 1992;

Ağaçdelen ve Acet, 1993; Oliveira ve ark., 2000;) ve geçiş oranının da 1/2200-1/2500 arasında olduğunu göstermektedir. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı'nın 16 Kasım 1997 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan mükerrer yazısında, yumurtacı tavuk yemlerinde bulunmasına izin verilen total aflatoksin limitinin 20 ppb olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, yem hammaddeleri ile yemlerde yapılan tarama sonuçları, bu kanuni sınırın sıklıkla aşıldığını göstermektedir. Nitekim, Nizamlioğlu ve Oğuz (2003) tarafından, Konya bölgesinden temin edilen yumurtacı tavuk yemleri ile mısır örnekleri üzerinde ELISA yöntemiyle yapılan taramalarda, yem örneklerinin %71'inde, mısır örneklerinin de %57.7'sinde 1.5-133 µg/kg yem düzeyinde aflatoksin tespit etmişlerdir. Aflatoksin saptanan yemlerin ancak %50'sindeki aflatoksin seviyesi 5 µg/kg'ın altındadır. İki yem örneğindeki aflatoksin seviyesi sırasıyla 25.8 ve 46.8 µg/kg, iki mısır örneğindeki aflatoksin seviyeleri ise sırasıyla 67.4 µg/kg ve 133 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Bakanlığın belirlediği sınır değer dikkate alınarak, günde 130 g yem tüketen ve gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında bulunması muhtemel olan aflatoksin miktarının 2,6 ng olduğu hesaplanmıştır (Hamilton, 1982; Çelik ve ark., 2000a). Ayrıca aflatoksinlerin tavuk embriyoları için toksik doz sınırının 0,3-30 ng/yumurta, teratojenik doz sınırının ise 3-30 ng/yumurta olarak belirlenmiş olduğu (Jelinek ve ark., 1985; Çelik ve ark., 2000a) dikkate alınır, yemlerde bulunmasına izin verilen AF düzeylerinin dahi tavukçuluk sektöründe, özellikle de kuluçkacılıkta önemli problemlere yol açma ihtimali yüksektir.

Lenfoid organların normal embriyonik gelişimleri dikkate alındığında, merkezi lenfoid organların embriyonik gelişimini baskılayan maternal yada çevresel etkenlerin, hayvanın perifer lenfoid organlarının gelişimini de baskılayacağı açıktır. Çelik ve ark. (2000a), yumurtaya verilen 10ng/yumurta dozundaki AFB<sub>1</sub>'in timus ve bursa Fabricii'de belirgin ışık mikroskopik değişikliklere yol açmamakla birlikte, 100ng/yumurta dozundaki AFB<sub>1</sub>'in hem timus ve hem de bursa Fabricii'nin embriyonik gelişiminde önemli derecede gerilemeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Sur ve Çelik (2003) tarafından gerçekleştirilen enzim histokimyasal bir çalışmada, daha düşük dozlardaki AFB<sub>1</sub>'in de tavuk embriyosunun hem perifer kanındaki lenfositlerin asit-fosfataz (ACPaz) enzimi pozitifite oranlarında ve hem de gelişmekte olan dalakta bu enzime sahip olan lenfositlerin sayılarında önemli azalmanın meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise deney gruplarının dalak taslaklarında lenf foliküllerinin histolojik gelişimlerinin baskılanmış olduğu ve artan dozla birlikte organ taslağında daha az sayıda hemopoietik odağın şekillendiği; küçük çaplı arterlerin

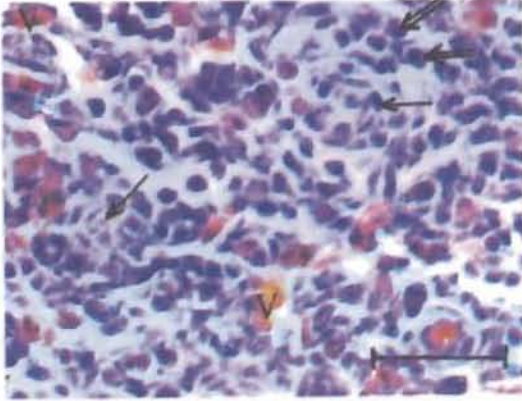
tunika adventisya katmanlarındaki lenfositlerin az sayıda oldukları tespit edilmiştir. Özellikle 20 ve 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> gruplarında, on üçüncü günde lenfatik kordonlarla lenf foliküllerinin gelişiminin önemli derecede baskılandığı dikkati çekmiştir. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde ise 5 ve 10 ng/yumurta dozunda AFB<sub>1</sub> verilen civcivlerin dalak kesitlerindeki lenf foliküllerinin oldukça küçük oldukları ve germinal merkezlerinin şekillenmediği, lenfatik kordonlardaki lenfoid hücre yoğunluğunun daha düşük olduğu gözlenmiştir. Dalağın beyaz pulpasındaki bu gelişme geriliğinin, daha önceki araştırmacıların (Graczyk, 1984,1987; Slowik ve ark., 1990; Çelik ve ark., 2000a; Sur ve Çelik, 2003) bulguları da dikkate alınarak AFB<sub>1</sub>'in merkezi lenfoid organların gelişmesinde neden olduğu baskılamadan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Deney gruplarında, dalaktaki PALS ve germinal merkezlerin her ikisinin de az gelişmeleri, AFB<sub>1</sub>'in hem timus ve hem de bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimlerini baskıladığını düşündürmektedir. Kuluçkadan çıkıştan sonra yapılan yedirme denemelerinde ise dalaktaki venöz sinuslarda genişleme (Sahoo ve ark., 1993) ile retiküler hücre hiperplazisinin yanı sıra (Balachandran ve Ramkrishnan, 1987) özellikle lenf folikülleri (Dafalla ve ark., 1987) ve PALS'taki lenfositlerde azalma (Tuzcu, 1999) tespit edilmiştir.

Aflatoksinlerin bağışıklık sistemi üzerindeki etki mekanizmaları hakkında farklı görüşler vardır. Bazı araştırmacılar (Meneghini ve Schumacher, 1977; Jeffery ve ark., 1984; Dugyala ve Sharma, 1996) AFB<sub>1</sub> ve metabolitlerinin, hepatositlerin DNA ve RNA'sına bağlanarak RNA-polimeraz enzimini baskıladığını; protein sentezinin baskılanması ve buna bağlı olarak da bağışıklık sistemi hücreleri arasında iletişimi sağlayan sitokinlerin sentezinin aksaması sonucunda da lenfoid sistem hücrelerinin çoğalıp farklılaşmalarının olumsuz yönde etkilendiğini bildirmektedirler. Yüksek dozda alınan AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu şiddetli karaciğer hasarının, serum proteinleri düzeylerinde ve özellikle de antikor düzeylerinde neden olduğu düşüşler, AFB<sub>1</sub>'in humoral bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini açıklamaktadır (Campbell ve ark., 1983; Sorenson ve ark., 1986; Jonaskiene ve ark., 1998). Öte yandan, özellikle düşük dozlarda alınan aflatoksinlerin hücresel bağışıklık sistemini baskıladığı ve bu etkinin de makrofajların fagositik aktivitelerinin inhibisyonu sonucunda ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (Neldon-Ortiz ve Qureshi, 1992a; 1992b; Çelik ve ark., 1996).

Embriyonal dönemde maruz kalınan AFB<sub>1</sub>'in, kuluçkadan çıkışı takip eden dönemlerde de mononükleer fagositik sistem hücrelerinin fonksiyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (Neldon-Ortiz ve Qureshi, 1992b). Neldon-Ortiz ve Qureshi'nin (1992a) sonuçları, söz konusu

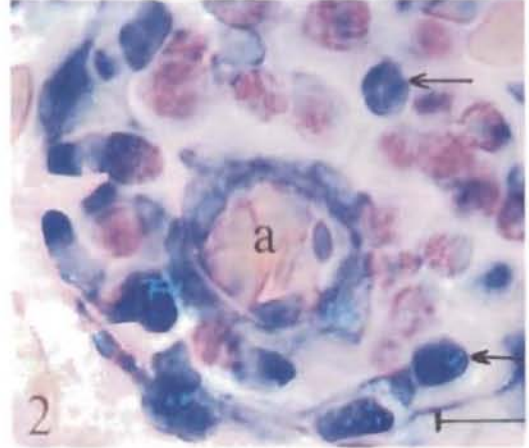
yetmezliğin, karaciğer kökenli karma fonksiyonlu monooksijenazların (Mix Function Oxygenase, MFO) varlığında daha da güçlendiğini ortaya koymaktadır. Zira MFO'lar AFB<sub>1</sub>'i daha toksik özellikleri olan AFB<sub>1-8,9</sub> epoksit türevlerine dönüştürmektedirler.

Elde edilen bulgulara dayanılarak, yumurtaya

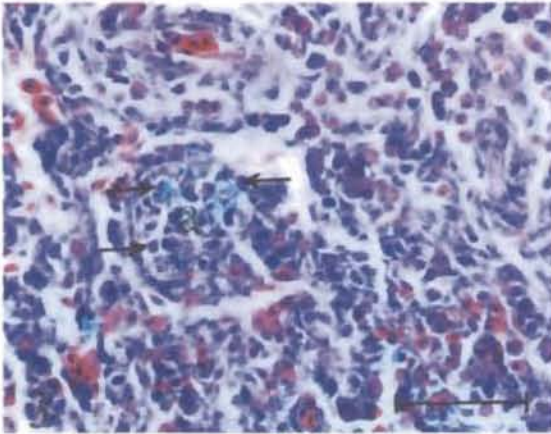


Şekil 1. Kuluçkanın on ikinci gününde, kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. Oklar: A.sentralisler; çift oklar: lenfositler; V: Venöz damar ağı. Üçlü boyama, Bar: 30 µm.

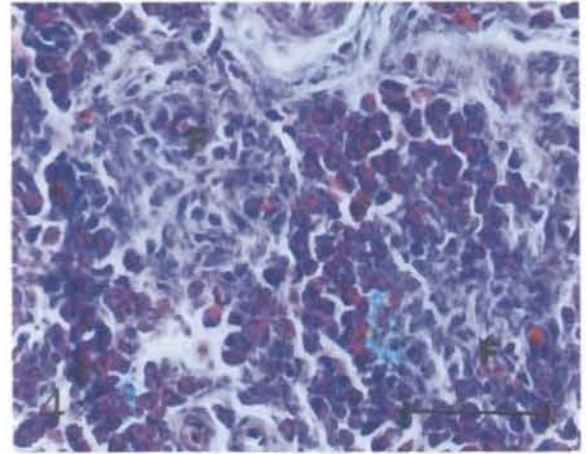
düşük dozlarda geçen AFB<sub>1</sub>'in, dalağın lenf folikülleri ile lenfatik kordonlarının gelişimini baskıladığı; özellikle PALS'taki T-lenfositler ile germinal merkezlerdeki lenfosit yoğunluğunda belirgin azalmalara neden olduğu, böyle hayvanların kuluçka sonrası dönemde hastalık etkenlerine karşı daha duyarlı olabilecekleri sonucuna vardı.



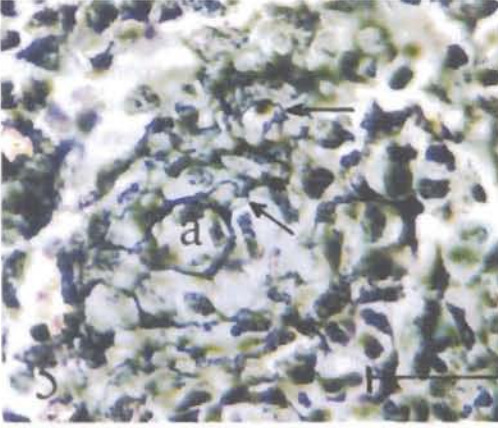
Şekil 2. Kuluçkanın on üçüncü gününde, kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. a: A.sentralis; Oklar: Lenfositler. Pappenheim'in panoptik boyası, Bar: 10 µm.



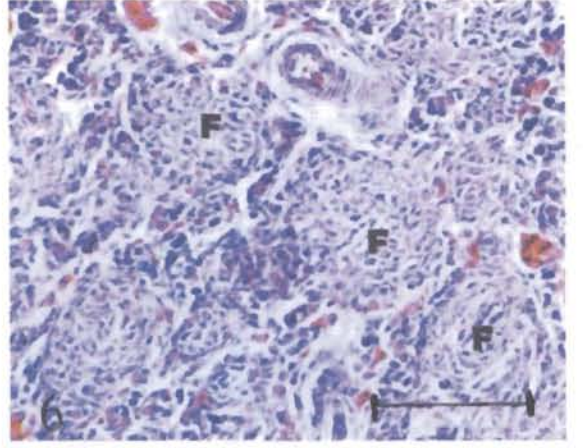
Şekil 3. Kuluçkanın on üçüncü gününde, kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. a: A.sentralis; Oklar: Lenfositler. Üçlü boyama, Bar: 40 µm.



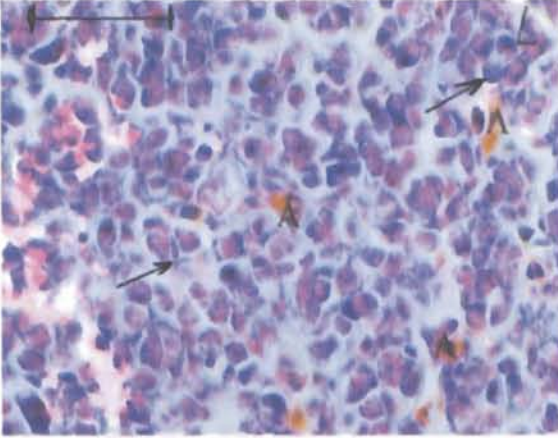
Şekil 4. Kuluçkanın on sekizinci gününde, kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. F: Lenf folikülleri. Üçlü boyama, Bar: 20 µm



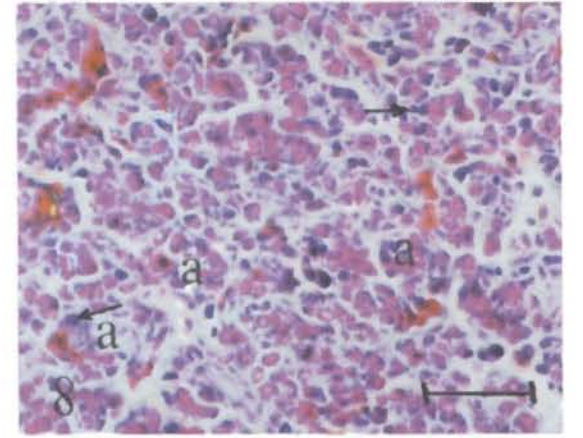
Şekil 5. Kuluçkanın on sekizinci gününde, solvent-kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. Oklar: Retiküler iplikler; a: A.sentralis. Gordon ve Sweet'in retiküler iplik boyası, Bar: 40  $\mu$ m



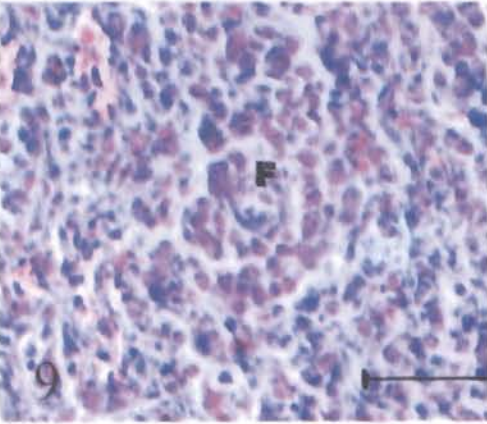
Şekil 6. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde, kontrol grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. F: Gelişimini hemen hemen tamamlamış ve germinal merkezleri soluk boyanan lenf folikülleri. Üçlü boyama, Bar: 100  $\mu$ m



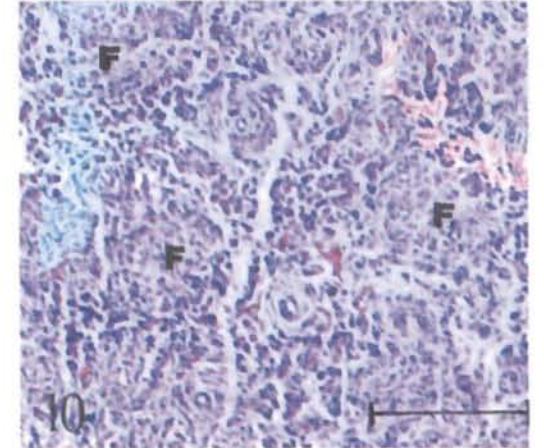
Şekil 7. Kuluçkanın on ikinci gününde, 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. Oklar: A.sentralisler; V: Venöz damar ağı. Üçlü boyama, Bar: 30  $\mu$ m.



Şekil 8. Kuluçkanın on üçüncü gününde, 40 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. a: A.sentralisler, Oklar: Lenfositler. Üçlü boyama, Bar: 40  $\mu$ m



Şekil 9. Kuluçkanın on sekizinci gününde, 10 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> grubundan bir embriyoya ait dalak F: Gelişimi basılanmış bir lenf folikülü. Üçlü boyama, Bar: 40  $\mu$ m



Şeki. 10. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde, 5 ng/yumurta AFB<sub>1</sub> grubundan bir embriyoya ait dalak kesiti. F: Gelişimi geri l : : ış lenf folikülleri. Üçlü boyama, Bar: 100  $\mu$ m

### Kaynaklar

Ağaçdelen H.H., Acet, H.A. (1993). Aflatoksin B<sub>1</sub> ve aflatoksin M<sub>1</sub>'in yumurtaya geçiş düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine deneysel araştırmalar. *Veterinarium*, 4, 2, 36-43.

Balachandran, C., Ramakrishnan, R. (1987). An experimental study on the pathology of aflatoxicosis in broiler chicken. *Indian Vet. J.*, 64, 911-914.

Bradbury, P., Gordon, K.C. (1990). Connective tissues and stains In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds., J.D. Bancroft, A. Stewens, 119-142, 3rd edition, The Bath Press, Avon.

Campbell, M.L., May, J.D., Huff, W.E., Doerr, A. (1983). Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poult. Sci.*, 62, 2138-2144.

Cilievici, O., Ghidus, I.C.E., 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.

Culling, C.F.A., Allison, R.T., Barr, W.T. (1985). *Cellular Pathology Technique*. Butterworths and Co Ltd, London.

Çelik, İ., Demet, Ö., Dönmez, H.H., Oğuz, H., Boydak, M. (1996). Aflatoksin ve aflatoksin bağlayıcısı olan polivinilpolipirrolidon (PVPP) verilen broylerde peritoneal makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinin belirlenmesi. *Vet. Bil. Derg.*, 12(1), 145-151.

Çelik, İ., Oğuz, H., Demet, Ö., Boydak, M., Dönmez, H.H., Sur, E., Nizamlioğlu, F. (2000a). Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999. *Br. Poult. Sci.*, 41, 4, 401-409.

Çelik, İ., Oğuz, H., Demet, Ö., Dönmez, H.H., Boydak, M., Sur, E. (2000b). Efficacy of polyvinylpyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br. Poult. Sci.*, 41, 4, 430-439.

Dafalla, R., Yagi, A.I., Adam, S.E.I. (1987). Experimental aflatoxicosis in Hybro-Type chicks: Sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. *Vet. Hum. Toxicol.*, 29, 3, 222-226.

Dieter, R.R., Qureshi, M.A., Nanna, U.C., Bloom, S.E. (1985). Embryonic exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>: Mutagenicity and influence on development and immunity. *Environ. Mutagenesis.*, 7, 715-725.

Dugyala, R.R., Sharma, R.P. (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.

Gabal, M.A., Azzam, A.H. (1998). Interaction of aflatoxin in the food and immunisation 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.

Graczyk, S. (1984). The effect of a single dose 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.

Hamilton P.B. (1982). Mycotoxins and farm animals. *Refush Vet.*, 39, 1-2, 17-45.

Jacobson, W.C., Wiseman, H.G. (1974). The transmission of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs. *Poult. Sci.*, 53, 1743-1745.

Jeffery, F.H., Morton, J.G., Miller, J.K. (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., Peterka, M., Rychter, Z. (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian J. Exp. Biol.*, 23, 588-595.

Jonauskienė, I., Petniunas, P., 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.

Kelly, D.E., Wood, R.L., Enders, A.C. (1984). Lymphatic organs. In "Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy", 18th edition, Ed., D.E. Kelly, R.L. Wood, A.C. Anders, Williams and Wilkins Baltimore, London.

Khan, M.Z.I., Hashimoto, Y., Asaduzzman, M. (1998). Development of T-cell sub-populations in postnatal chicken lymphoid organs. *Veterinarski Arhiv.*, 68(5), 183-189.

Kocaöz, N., Çelik, İ., Ünsal, S. (1997). Tavuk bursa Fabricisi'nin embriyonal gelişmesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. *Vet.Bil.Derg.*, 13,1:43-51.

Konuk, T. (1981). *Pratik Fizyoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yayın., 378, A.Ü. Basımevi, Ankara.

Latshaw, W.K. (1987). Mesenteries and compartmentalisation. In "Veterinary Developmental Anatomy", Ed., B.C. Decker, Inc PO Box 30246, 169-180, Philadelphia, Pennsylvania.

Leeson, S., Diaz, G., Summers, J.D. (1995). Aflatoxins. In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds., S. Leeson., J.D.G. Gonzala, J.D. Summers, Published by: University Books, 249-298, PO Box 1326, Guelph, Ontario, Canada.

Maskar, Ü. (1976). *Embriyoloji Ders Kitabı*. 5. Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul.

Meneghini, R., Schumacher, R.I. (1977). Aflatoxin B<sub>1</sub>, a selective inhibitor of DNA synthesis in mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.*, 18, 3, 267-276.

Neldon-Ortiz, D.L., Qureshi, M.A. (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, D.L., Qureshi, M.A. (1992b). Effects of AFB<sub>1</sub> embryonic exposure on chicken mononuclear phagocytic cell functions. *Dev. Comp. Immunol.*, 16, 2-3, 187-196.

- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1977). Lymphatic system. In "Anatomy of The Domestic Birds", Translation by W.G.Siller, P.A.L.Wight, 103-107, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg, Germany.
- Nizamliöglu, F., Oğuz, H.(2003). Occurence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya Province, Turkey. *Food Addit. and Cont.*, 20,7, 654-658.
- Oğuz, H. (1997). Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirrolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Oliveira, C.A.F., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R., Corrêa, B. (2000). Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Ad. Cont.*, 17, 6, 459-462.
- Özer, A., Minbay, A., Özcan, Z., Yakışık, M., Çarlı, T. (1989). Deneysel aflatoksin zehirlenmesinin tavuklarda immun sistem hücrelerine ve antikor oluşumuna etkisi. *Doğa T.Ü. Vet. ve Hay. D.*, 13, 2, 164-170.
- Sandıkçı, M., Çelik, İ. (2000). Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetattın bu organ üzerine etkisi. *Vet.Bil.Derg.*, 16,2:81-88.
- Sahoo, P.K., Chattopadhyay, S.K., Johrp, T.S., Charan, K., Sikdar, A. (1993). Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits. *Indian J. Anim. Sci.*, 63, 3, 268-273.
- Slowik, J., Kuryzko, J., Graczyk, Z., 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. Arh.Weter.*, 30,3-4,75-87.
- Sorenson, W.G., Gerberick, G.F., Lewis, D.M., Castranova, V. (1986). Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro. *Environ. Health Perspec.*, 66, 45-53.
- Sudhakar, B.V. (1992). The carry-over effect of aflatoxin B1 into eggs and liver of chicken. *Indian Vet. J.*, 69, 1061-1062.
- Sur, E., Çelik, İ.(2003). Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br.Poult.Sci.*, 44, 4, 558-566.
- Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı (1997). Aflatoksin kontrolüne dair tebliğ. *Resmi Gazete*, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.
- Tuzcu, M. (1999). *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999 suşu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.