T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUNSET YELLOW FCF'NİN (E110), TAVUKLARIN TİMUS VE BURSA FABRİCİİ'SİNİN EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Elif Ayşe BERKTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUNSET YELLOW FCF'NİN (E110), TAVUKLARIN TİMUS VE BURSA FABRİCİİSİNİN EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Elif Ayşe BERKTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202034 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Bu çalışmada enzim histokimyasal yöntemlerin yanı sıra üçlü boyama ve May-Grünwald-Giemsa boyama yöntemleri uygulanarak, yaygın olarak kullanılan bir gıda boyası olan Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk timus ve bursa Fabricii'sinin embriyonik gelişmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sunset Yellow FCF'nin (E110), merkezi immün sistem organları olan timus ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin morfolojik bulgularının ortaya konması amaçlanan bu çalışma sonuçlarının, konu üzerinde daha sonra yapılacak olan çalışmalara hem yöntem ve hem de bulgu açısından temel veri sağlaması da hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyesi ve Danışmanım Prof. Dr. İlhami Çelik'e, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Emrah Sur, Doç. Dr. Yasemin Öznurlu ve Doç Dr. Tuğba Özaydın'a; bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Özge Çelik'e, öğrencilerime, aileme ve projeyi maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÇİZELGELER DİZİNİ	**v**
ŞEKİLLER DİZİNİ	**v**
SİMGELER VE KISALTMALAR	**vii**
1.GİRİŞ	**1**
1.1. Sunset Yellow FCF (E110)	2
1.1.1. Metabolizması Kısa Dönem Maruziyet Çalışmaları	3
1.1.2. Uzun Dönem Maruziyet Çalışmaları	6
1.1.3. İnsanlar Üzerine Yapılan Çalışmalar	8
1.2. Timus	9
1.2.1. Timusun Histolojisi	9
1.2.2. Timusun Embriyonik Dönemdeki Gelişimi	11
1.2.3. Timusun İnvolüsyonu	11
1.3. Bursa Fabricii	12
1.3.1. Bursa Fabricii Histolojisi	12
1.3.2. Bursa Fabricii Embriyonik Dönemdeki Gelişimi	13
1.3.3. Bursa Fabricii'nin İnvolüsyonu	15
1.3.4. Bursa Fabrici'nin Fonksiyonları	16
1.4. Asit Fosfataz Enzimi	17
1.5. Alfa Naftil Asetat Esteraz Enzimi	18
2.GEREÇ VE YÖNTEM	**20**
2.1. Materyal	20
2.1.1. Yumurta Materyali	20
2.1.2. Sunset Yellow FCF(110)	20
2.2. Metot	20
2.2.1. Sunset Yellow FCF(110) Solüsyonlarının Hazırlanması	20
2.2.2. Deney gruplarının oluşturulması ve Sunset Yellow FCF(110) Solüsyonlarının yumurtalara verilmesi	21
2.2.3. Doku örneklerinin alınması	21
2.2.4. Alfa-naftil asetat esteraz (ANEA) demonstrasyonu	22

2.2.5. Asit fosfataz (ACP-az) demonstrasyonu..... 23
3. BULGULAR..... 24
3.1. Makroskopik Bulgular ve Embriyonik Ölüm Oranları..... 24
3.2. Kontrol ve Deney Gruplarında Timusun Embriyonik Gelişimi..... 25
3.2.1. Kuluçkanın On Birinci Günü..... 25
3.2.2. Kuluçkanın On Beşinci Günü..... 27
3.2.3. Kuluçkanın On Sekizinci Günü..... 29
3.2.4. Kuluçkadan Çıkış Günü..... 31
3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında Bursa Fabricii'nin Embriyonik Gelişimi.... 33
3.3.1. Kuluçkanın On Birinci Günü..... 33
3.3.2. Kuluçkanın On Beşinci Günü..... 36
3.3.3. Kuluçkanın On Sekizinci Günü..... 39
3.3.4. Kuluçkadan Çıkış Günü..... 42
4. TARTIŞMA..... **46**
5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... **55**
6. ÖZET..... **56**
7. SUMMARY..... **57**
8. KAYNAKLAR..... **58**
9. EKLER..... **66**
Ek.A Etik kurul kararı..... 66
10. ÖZGEÇMİŞ..... 67

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler..... 21

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kuluçkanın 15. gününde 2. deney grubundan bir embriyo..... 24
Şekil 3.2. Kuluçkanın 15. gününde 3. deney grubundan bir embriyo..... 24
Şekil.3.3. Kuluçkanın 11. gününde Kontrol 1 grubundan bir timus kesiti..... 26
Şekil 3.4. Kuluçkanın 11. gününde 3. deney grubundan bir timus kesiti..... 26
Şekil 3.5. Kuluçkanın 11. gününde 3. deney grubundan bir timus kesiti..... 27
Şekil 3.6. Kuluçkanın 15. gününde Kontrol 2 grubundan bir timus kesiti..... 28
Şekil 3.7. Kuluçkanın 15. gününde 3. deney grubundan bir timus kesiti..... 28
Şekil 3.8. Kuluçkanın 15. gününde 3. deney grubundan bir timus kesiti..... 29
Şekil 3.9. Kuluçkanın 18. gününde Kontrol 1 grubundan bir timus kesiti..... 30

Şekil 3.10. Kuluçkanın 18. gününde 2. deney grubundan bir timus kesit..... 30
Şekil 3.11. Kuluçkanın 18. gününde Kontrol 2 grubundan bir timus kesiti..... 31
Şekil 3.12. Kuluçkanın çıkış gününde Kontrol 1 grubundan bir timus kesiti..... 32
Şekil 3.13. Kuluçkanın çıkış gününde Kontrol 1 grubundan bir timus kesiti..... 32
Şekil 3.14. Kuluçkanın çıkış gününde 2. deney grubundan bir timus kesiti..... 33
Şekil 3.15. Kuluçkanın 11. gününde Kontrol 1 grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 34
Şekil 3.16. Kuluçkanın 11. gününde 2. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 35
Şekil 3.17. Kuluçkanın 11. gününde 3. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 35
Şekil 3.18. Kuluçkanın 11. gününde Kontrol 2 grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 36
Şekil 3.19. Kuluçkanın 15. gününde Kontrol 1 grubundan bir bursa Fabricii kesit..... 38
Şekil 3.20. Kuluçkanın 15. gününde 3. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 38
Şekil 3.21. Kuluçkanın 15. gününde 2. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 39
Şekil 3.22. Kuluçkanın 15. gününde Kontrol 1 grubundan bir bursa Fabricii kesit..... 39
Şekil 3.23. Kuluçkanın 18. gününde Kontrol 1 grubundan bir bursa Fabricii kesit..... 41
Şekil 3.24. Kuluçkanın 18. gününde 1. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 41
Şekil 3.25. Kuluçkanın 18. gününde 3. deney grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 42
Şekil 3.26. Kuluçkanın 18. gününde Kontrol 1 grubundan bir bursa Fabricii kesit..... 42
Şekil 3.27. Kuluçkanın çıkış gününde Kontrol 2 grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 43
Şekil 3.28. Kuluçkanın çıkış gününde Kontrol 2 grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 44
Şekil 3.29. Kuluçkanın çıkış gününde Kontrol 2 grubundan bir bursa Fabricii kesiti..... 44

Şekil 3.30. Kuluçkanın çıkış gününde 3. deney grubundan bursa Fabricii kesiti..... 45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP: Asit fosfataz

ADI: Acceptable Daily Intake (Günlük Alım Seviyesi)

ANAE: Alfa naftil asetat esteraz

ChEs: Cholinesterases (Kolinesteraz)

CHEST: Chicken Embryotoxicity Screening Test (Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi)

FAE: Folikül ilişkili epitel

IFE: İnterfoliküler epitel

MN: Mikronükleus

HET: Hen’s Eggs Test (Tavuk Yumurta Testi)

1. GİRİŞ

Gıda boyaları, gıdaların cazibesini artırdığından, gıda katkı maddeleri içerisinde önemli bir grubu oluşturur. Belirlenen limitler aşılmadığında bu gıda katkı maddelerinin önemli yan etkilerinin olmadığı ifade edilse de, satışa sunulan gıdalardan alınan 545 gıda numunesinin büyük bir kısmında izin verilen oranların aşıldığı, en çok kullanılan gıda boyasının da tartrazin ve Sunset Yellow FCF (E110) olduğu saptanmıştır.

Bir azo boya olan Sunset Yellow FCF (E110), pek çok hazır gıda ve gıda katkı maddesinde renklendirici olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Her ne kadar önerilen miktarlarda kullanıldığında toksik etkisi olmayan, güvenli bir gıda boya maddesi olarak bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalar, Sunset Yellow FCF (E110)'u tüketen ve başka maddelere (örneğin aspirin) duyarlı bireylerde çapraz reaksiyon sonucu aşırı duyarlılık ve alerjik yanıtların oluştuğu konusunda önemli bulgular vardır.

Sunset Yellow FCF (E110), muhtemel bir karsinojen olan Sudan I'in sülfonatlı versiyonu olduğundan, üretim sonunda elde edilen üründe belirli bir miktarda Sudan I bulunabilmektedir. Sunset Yellow FCF'nin (E110) kendisiyse aspirin intoleransı (duyarlılığı) olanlarda ortaya çıkan alerjik reaksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Bu reaksiyonlar arasında, ishal, kusma, ürtiker, derinin anjiyo ödemi önemli olanlardır. Sunset Yellow FCF'nin (E110) çocuklardaki hiperaktiviteyle de ilişkisi olduğu ileri sürülmüştür.

Aralarında Sunset Yellow FCF'nin de (E110) bulunduğu azo grubu gıda boyalarının sebep olduğu rahatsızlıklar arasında ürtiker, astım, rhinitis, anjiyo ödem, purpura ve nadir olarak da anaflaktik şok, baş ağrısı ve gastrointestinal bozukluklar bulunmaktadır. Ürtikerli veya anjiyoödemli hastaların bazılarında Allura Red AC, Amaranth, Sunset Yellow FCF (E110), Ponceau 4R ve tartrazine karşı hassasiyet tespit edilmiştir. Hiperaktif çocukların içeceklerinden yapay renklendiriciler (tartrazin, azorubin, Sunset Yellow FCF, Ponceau-4R), koruyucu maddelerden de sodyum benzoat çıkarıldığında, çocuklar normale dönmekte fakat bu maddeleri içeren içeceklerin tekrar verilmesiyle davranış bozuklukları yeniden ortaya çıkmaktadır.

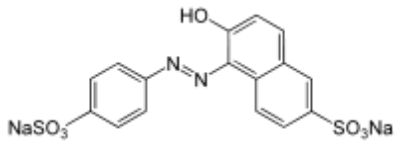
Kanatlı bağışıklık sistemi, embriyonik gelişimi üzerinde kolayca dış uygulamaların yapılabildiği sistem olması ve B lenfositlerin geliştiği bursa Fabricii'nin belirgin bir anatomik bir organ halinde bulunması nedeniyle kuluçkalık tavuk yumurtası, deneysel çalışmalarda son yıllarda sıkça tercih edilen bir materyaldir.

Gerçekleştirilen bu araştırmada, Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) yöntemiyle Sunset Yellow FCF'nin merkezi immün sistem organları olan timus ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

1.1. Sunset Yellow FCF (E110)

Orange Yellow S, FD&C Yellow 6, C.I. Food Yellow 3, C.I. 15985 veya INS No. E110 (CAS No. 2783-94-0) olarak da bilinen ve gıda katkı maddesi olarak E110 koduyla tanınan gıda renklendiricilerinin en önemlilerinden olup, suda iyi çözünen sarı renkli bir tozdur. Oldukça kompleks kimyasal yapıya sahip bir sentetik azo boyası olan Sunset Yellow FCF'un kimyasal adı disodyum 6-hidroksi-5-(4-sülfofenil)azo)-2-naftelensülfonik asidin disodyum tuzudur (Şekil 1.1). Bu bileşikler, bir azo köprüsüyle birbirine bağlanmış iki aromatik halka içerdiklerinden, genelde koyu renklidirler.

Üretim sırasında düşük miktarda 3-hidroksi-4[(4-sülfofenil)azo]-2,7-naftalensülfonik asitin trisodyum tuzu ilave edilebilir. Moleküldeki, diazo çekirdeği (-N=N-) *p*-sülfonik asit grubuyla yer değiştirmiş bir benzen halkası ile o-hidroksi ve *p*'-sülfonik asit gruplarıyla yer değiştirmiş bir naftalen halkası içerir. Boyanın endüstriyel üretimi, diazotize sülfanilik asitin 2-naftol-6-sülfonik asitle birleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Boya sodyum tuzu halinde saflaştırılır ve kurutulur.



Şekil 1.1. Sunset Yellow FCF (E110)'un moleküler yapısı.

Sunset Yellow FCF'nin 25°C sudaki çözünürlüğü 190,000 mg/L ve 60°C'de 200,000 mg/L'dir (Marmion 1991). Çözünürlük saf (%100) gliserinde 25°C'de 200,000 mg/L, 60°C'deki etil alkolde 10 mg/L'dir (Marmion 1991).

Sunset Yellow FCF suda hidrolize olan ester, amid, asetal, epoksit, lakton gibi fonksiyonel grupları içermez. Sudaki reaksiyon potansiyeli, aromatik sülfonik asitin veya bunun muadili olan sülfonik asit tuzunun desülfonasyonudur. Sulu asitte (sülfürik asit), aromatik sülfonik asitler 100-175°C arasında desülfone olurlar. Bu koşullar doğal ortamda gerçekleşmez. Bu yüzden, Sunset Yellow FCF (E110) ve bunun muadili tuzlar suda kararlı yapılarını sürdürme eğilimindedirler.

Azo boyaların bir fenolik -OH ve iki sülfonik asit grubunun eşzamanlı yer değiştirmesiyle biyo bozunumu, bu maddelerin aktif çamur tarafından abzorbe edilmediğini, bu yüzden de biyo bozunur olmadıklarını ortaya koymaktadır (Shaul ve ark 1990).

Sunset Yellow FCF (E110) ABD'de ilk defa 1929 yılında FD&C Yellow No. 6 olarak gıda boyası listesine alınmıştır. Bu ülkede 1994 yılında üretim sertifikası verilen ürün miktarı 994,406 kg FD&C Yellow No. 6 boya ve 283,680 kg da FD&C Yellow No. 6 lake formundadır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda ve Tarım Örgütü Birleşik Gıda Katkı Maddelerini Değerlendirme Uzmanlar Komitesi (WHO/FAO JECFA), 1982 yılında bu boyanın güvenilirliğini değerlendirmiş ve ortalama günlük tüketim miktarını (Average Daily Intake, ADI) 0-2.5 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiştir.

Sunset Yellow FCF (E110) sıklıkla Amaranth (E123) ile birlikte, çikolata ve karamelde kahverengi renk elde etmek için kullanılır. Yüksek konsantrasyonlarda faz değiştirerek, izotropik sıvı fazından nematik likit kristal fazına geçer. Bu durum, oda sıcaklığında 0.8 M-0.9 M arasında gerçekleşir.

Sunset Yellow FCF'nin farmakokinetiği ve metabolizması üzerinde yapılan çalışmalar kısa ve uzun dönem çalışmaları olmak üzere 2 bölümde ele alınmaktadır.

1.1.1. Metabolizması ve Kısa Dönem Maruziyet Çalışmaları

Sunset Yellow FCF'nin (E110) LD_{50} dozu olarak ifade edilen en düşük seviyeli oral akut toksik dozu sıçanlarda 2,000 mg/kg (Lu ve Lavalle 1964) ve sıçanlarda 10,000 mg/kg farelerde ise 6,000 mg/kg'dan büyük olarak belirlenmiştir (Gaunt ve ark 1967).

Genotoksisite belirleme amacıyla yapılan in vitro kromozom hasarı testlerinden birinde metabolik aktivasyona uğramayan Sunset Yellow FCF (E110), 6,000 µg/mL konsantrasyonda pozitif sonuç vermiş olmakla birlikte (Ishidate ve ark 1984), başka bir testte metabolik aktivasyona uğramış ve uğramamış formları 5000 µg/mL konsantrasyonda etkisiz bulunmuştur (Ivett ve ark 1989). Sunset Yellow FCF (E110) ile yapılan kardeş kromatid değişimi analizinde (sister chromatid exchange, SCE assay) 5,000 µg/ml'ye kadarki konsantrasyonları çelişkili sonuçlar vermiştir (Ivett ve ark 1989).

Kemiricilerde yapılan in vivo genotoksisite testlerinden mikronükleus (MN) testinde, erkek sıçanlara 10 ml/kg vücut ağırlığı hacminde olacak şekilde 500 veya 1,000 mg/kg dozunda oral yolla verilen Sunset Yellow FCF, kemik iliğindeki polikromatofilik eritrositlerdeki MN frekansında artışa neden olmamıştır (Westmoreland ve Gatehouse 1991). Sunset Yellow FCF'un 500 mg/kg vücut ağırlığında ağız yoluyla verilen dozu, DNA sentezi zamanlamasında değişikliğe yol açmamıştır (Kornbrust ve Barfknecht 1985). Tekrarlayan dozlarla yapılan in vivo çalışmalarda gıdayla 0; 6,000; 12,500; 25,000; 50,000 veya 100,000 ppm miktarında Sunset Yellow FCF 12 hafta süreyle verilmiştir.Erkek farelerden 100,000 ppm Sunset Yellow FCF alanlarda ortalama canlı ağırlık kazancı kontrollerden düşük bulunmuştur. Dişilerdeki canlı ağırlık kaybı 12,500 ve 100,000 ppm grupları arasında da gözlenmiştir. Hiçbir grupta Sunset Yellow FCF ile ilgili gros histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Kabul edilen yan etki gözlenmeyen dozun (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), dişi sıçanlar için 6,000 ppm ve erkek sıçanlar için de 12,500 ppm olduğu belirtilmiştir (NTP 1981).

Erkek ve dişi sıçanlarda yapılan yüz üç hafta gibi uzun süreli ve 12,500; 50,000 ppm dozundaki yedirme denemelerinde Sunset Yellow FCF E110'nun karsinojenitesi olmadığı bildirilmiştir (NTP 1981).

Embriyotoksisite denemelerinde, Charles River CD sıçanlarına mide sondasıyla 100; 300 ya da 1,000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda verilen Sunset Yellow FCF'nin embriyotoksisitesinin gözlenmediği ifade edilmiştir. Benzer şekilde, Sunset Yellow FCF'nin reprodüktif sistem üzerinde olumsuz etiklerinin olmadığı da tespit edilmiştir (International Research and Development Corporation 1972).

Sunset Yellow FCF'nin (E110) toksisitesi son olarak, Joint FAO/WHO Gıda Katkıları Uzmanlar Komitesi tarafından 1964'te değerlendirilmiştir (Annex I, ref. 8). Sunset Yellow FCF'nin (E110) en önemli metabolizma yolu sindirim kanalında gerçekleşen bakteriyel azo indirgemesidir. Oluşan en önemli metabolitler sülfanilik asit ve amino-2-naftol-6-sülfonik asittir (Honohan ve ark 1977). Ağız yoluyla tek dozda verilen 100 mg Sunset Yellow FCF'nin (E110) % 0.8'i, yıkımlanmamış boya olarak dışkıyla atılmıştır (Radomski ve Mellnger 1962). Yine ağızdan hayvan başına tek doz verilen 50 mg Sunset Yellow FCF'nin (E110) %3.6'sı sindirim kanalından emilmiştir.

Kullanımında vücutta oluşan metabolitlerin başlıcası, azo bağlarının indirgenme yoluyla parçalanmasıyla oluşan ürünlerdir. Karaciğer enzimleri azo bağlarının parçalanmasında kısmen rol oynar. Bu yüzden, aromatik aminlerin ve aminosülfonik asitlerin parçalanmasında bağırsak bakterilerinin rolü muhtemelen daha fazladır (Radomski ve Mellinger 1962). Damardan verilen bu renk maddesinin verilen miktarının ortalama %22'si (%20-30) 6 saat sonra yıkımlanmadan kalmaktadır. İdrarla atılan miktarlar incelendiğinde; 2-25 mg arasında verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) 72 saat sonra %0.3 ve %1.5'i, verilen boya halinde, %37'si de sülfanilik asitin muadilleri halinde idrarla atılmaktadır (Ryan ve Wright 1961).

Radyoaktif karbonla işaretlenen (^{14}C-Sunset Yellow FCF (E110), 2,7 mg, 4.62 μCi) boya verilmesinden 96 saat sonra idrarla atılan radyoaktivitenin, verilen dozun %8,5'nin 1-amino-2-naftol-6-sülfonik asit eşleniği, % 37.4'nün sülfonik asit eşleniği ve % 0.3'nün de yıkımlanmamış boya olduğu bulunmuş; Sunset Yellow FCF'nin (E110) safrayla atılım oranının %1.5 olduğu tespit edilmiştir (Honohan ve ark 1977). Sunset Yellow FCF (E110) verilen sıçanların yirmi dört saatlik idrarında %40 oranında sülfanilik asit muadilleri bulunmuştur. Bu oran da, yıkımlanmamış dozun %1-2'sine karşılık gelmektedir (Honohan ve ark 1977).

Mathur ve ark (2005a) 250 ve 1,500 mg Sunset Yellow FCF/kg vücut ağırlığı/gün dozu karşılığındaki boyanın 90 gün boyunca verildiği sıçanlardan her iki grubun testislerinde önemli etkiler gözlenmiştir. Bu iki dozdan 250 mg Sunset Yellow FCF/kg vücut ağırlığı/gün dozun zararlı etkinin gözlendiği en düşük doz (The lowest dose tested is a Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL) olduğu sonucuna varılmıştır (Mathur ve ark 2005b). Bu doz daha önce JECFA tarafından

kabul edilebilir günlük alım seviyesinin (ADI) hesaplanmasında yararlanılan 500 mg/kg vücut ağırlığı olarak kabul edilen yan etki gözlenmeyen doz (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) seviyesinden daha düşüktür.

Sıçanlarda Sunset Yellow FCF'nin (E110) östrojenik etkisi bulunmamıştır (Graham ve Allmark 1959). Derialtı yolla 7 ay boyunca, 1 ml miktarında %1'lik Sunset Yellow FCF (E110) solüsyonu verilen 22 sıçana toplam 55 enjeksiyon yapılmış ve hayvanların sadece birinde periton tümörü gelişmiştir (Deutsche Forschungsgemeinschaft 1957).

Bir başka araştırmada ise, içme suyuyla 10 ay süreyle %2'lik Sunset Yellow FCF verilen 16 sıçan grubunda genç hayvanların büyümesi hızlanmış, yaşama kabiliyetleri artmıştır. Karaciğerde histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir (Manchon ve Lowy 1964).

Doksan gün süreyle Sunset Yellow FCF (E110) verilen 15'i erkek, 15'i de dişi toplam 30 sıçanın büyüme ve gıda dönüştürme oranlarında fark gözlenmezken, %3'ünde çalışma boyunca, %2'sinde de ilk haftalarda hafif ishal oluşmuştur. Hematolojik verilerde normalden sapma oluşmamış, karaciğer ve böbrek fonksiyonları bozulmamıştır. Otopside, sekum %2-3 oranında, testisler %3 oranında büyümüştür. Bununla birlikte, Sunset Yellow FCF'den (E110) kaynaklandığı düşünülen histolojik değişiklikler gözlenmemiştir (Gaunt ve ark 1967).

Kobay da Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı aşırı duyarlılık görülmemiştir (Bär ve Griepentrog 1960).

Ağız yoluyla verilen Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tartrazinin, genotoksik etkisiyle apoptozis üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, söz konusu gıda boyaları 2,000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 24 saat aralıklarla iki kez verilmiştir. Kolon epitel hücrelerinin mitoz sıklığı artmış olmakla birlikte, mikronükleus sıklığı artmamıştır (Sasaki ve ark 2002).

1.1.2. Uzun Dönem Maruziyet Çalışmaları

Daha önce yapılan deneysel bir çalışmada (Gaunt 1974), otuz hayvandan oluşan fare grubuna içme suyuyla %0.05'lik Sunset Yellow FCF (E110) 52 hafta süreyle verilmiş ve yaşam süreleri boyunca yaşatılmıştır. Hayvanların haftalık boya

tüketimi 17 mg, toplam boya tüketimiyse 884 mg/fare olmuştur. Hayatta kalan 7 hayvanda 9 lenfoma tümörü ve bir malign bağırsak tümörü gelişmiştir. Kontrol olarak kullanılan 60 hayvandan 13'ündeyse 5 lenfoma ve 1 bağırsak tümörü gelişmiştir (Bonser ve ark 1956). Boyanın tümör oluşumunda etkisi olmadığını gösteren bildirimler de vardır (FDA 1964). Seksen haftalık bir başka yedirme denemesinde ise, Sunset Yellow FCF'nin (E110) canlı ağırlık kazanma hızı ve organ ağırlıkları üzerinde olumsuz etkisi bulunmamıştır. Histopatolojik değişiklikler ve tümör şekillenmesi bakımından da kontrol grubuyla deney grubu arasında önemli fark bulunmamıştır (Gaunt 1974).

Hamsterlerde yapılan bir çalışmada ise, derialtı veya periton içi enjeksiyonla verilen 1.0 mg Sunset Yellow FCF (E110), 330 günlük dönemde mortaliteyi değiştirmemiş ve tümör oluşumuna yol açmamıştır (Price ve ark 1978).

Sıçanların yemine %4 oranında katılan Sunset Yellow FCF (E110) 18 ay boyunca yedirilmiş ve mide bez epitel hücrelerinde boyanmaya ve ince bağırsakta granüler birikmelere neden olmakla birlikte, tümör oluşumuna neden olmamıştır (Willheim ve Ivy 1953). Gıdayla 64 hafta süreyle 4 farklı dozda (%0; %0.03; %0.3 ve %1.5) Sunset Yellow FCF (E110) verilen sıçanlarda gıda tüketimi, büyüme, organ ağırlıkları, histopatoloji ve kan tablosu değişmemiş, tümör görülme sıklığı artmamıştır (Mannell 1958). Bununla birlikte, daha yüksek miktarlarda (%0; %0.5; %1.0; %2.0 ve %5.0) Sunset Yellow FCF (E110) verilen 24 sıçanda meme tümörü görülme sıklığı artmıştır. Tümör görülme sıklığı gruplara göre sırasıyla 2; 1; 6; 3 ve 6 olarak bulunmuştur (FDA 1964). Her iki cinsiyetten sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 79 ve 102 haftalık yedirme denemelerinde, hayvanlarda istatistiksel açıdan önemsiz gelişme geriliği gözlenmiştir. Karaciğerde yaşlanmayla ilgili değişiklikler gözlenmiş olmakla birlikte, neoplastik değişiklikler görülmemiş ve karsinojenite tespit edilmemiştir.

Köpeklerde yapılan yedirme çalışmalarında (FDA 1964), hayvanlar %1 ve %5'lik boya ilave edilen gıdayla 2-3 ay beslenmiştir. Beagle ırkı 4'er hayvandan oluşan iki gruptan %5'lik grupta 2, %1'lik grupta da 1 hayvan ilerleyici şekilde canlı ağırlık kaybetmiş ve 2-3 ay sonunda ötenazi edilmek zorunda kalınmıştır. Genel olarak, gıdada %5 oranında bulunan Sunset Yellow FCF (E110) orta derecede, %1 oranındakiyse hafif derecede toksik olarak değerlendirilmiştir. Kilo kaybı ve ishal

ana belirtilerdir. Kaba ve mikroskobik değişiklikler görülmekle birlikte, bulgular karakteristik değildir. Bununla birlikte, 5 Beagle ırkı köpekte yapılan çalışmada 7 yıl süreyle verilen %2.0 oranındaki boyanın toksik etkisi bulunmamış ve histopatolojik değişikliklere yol açmadığı tespit edilmiştir (FDA 1964).

Osman (1993), Sunset Yellow FCF'nin (E110) in vitro koşullarda gerçek ve yalancı kolinesterazları (ChEs) inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etki karışık etki tarzında olup; kompetitif ve non-kompetitif olmak üzere her iki tip inhibisyon da gerçekleşmektedir. Boyanın inhibiyon etkisi geri dönüşümlüdür (Osman ve ark 1993).

Ershoff (1977), stok gıdada %5 oranında bulunan Sunset Yellow FCF'nin (E110), sıçanlarda makroskobik olarak tespit edilebilen toksik etkilerinin olmadığını bildirmiş; ancak, pürifiye yemde aynı orandaki Sunset Yellow FCF'nin (E110) 14 günlük deneme süresinde büyümede belirgin gerileme, tüylerin düzensizleşip dikleşmesi, %50'den fazla sıçanın ölümüyle sonuçlandığını tespit etmiştir. Gözlenen bu toksik etkilerin sarı psillium tohumu (Plantago ovata) tozu, havuç kökü tozu, yonca yaprağı ve buğday kepeğiyle ters etkileşim sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Ershoff 1977).

Önerilen dozlarda kullanıldığında, Sunset Yellow FCF'nin (E110) hayvan ve insanlarda karsinojenik etkisinin olmadığı, sıçan ve köpeklerde önerilen dozun katlarının (1X, 10X, 30X ve 100X), nesiller boyu üreme üzerinde yan etkisinin olmadığı, E. coli ve Salmonella typhimuriumla yapılan çalışmalarda mutajenik ve teratojenik etkilerinin olmadığı edilmiştir. Tavşanlarda 100, 300 ve 1,000 mg/kg/gün dozunda ve gebeliğin 6 ve 18. günlerinde ağızdan verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110); vücut ağırlığı, corpus luteum gelişimi, erken ve geç rezorpsiyon, canlı ya da ölü ortalama fetüs canlı ağırlığı, cinsiyet oranı, genel organ ve iskelet anomalileri üzerindeki etkileri incelenmiş ve sadece 1,000 mg/kg/gün Sunset Yellow FCF'nin (E110) verilen hayvanlarda tam olmayan yapışık ikizlik oranında artış dikkati çekmiştir (International Research and Development Corporation 1972).

1.1.3. İnsanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde, gıdalarda yapılan bir tarama çalışmasında (Yentür ve Karakaya 1985), incelenen 29 dondurma örneğinin 16'sında Gıda Tüzüğü'ne göre izin

verilmeyen çeşitli sentetik boyalara (Tartrazin, Sunset Yellow FCF (E110), Ponceau 4R, Ponceau SX) rastlanmıştır.

Sunset Yellow FCF'yle (E110) yapılan deri testinde, p-fenilendiamine karşı ekzematöz aşırı duyarlılığı olan kişilerin Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı da çapraz duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çapraz reaksiyon, boya molekülünün, yapısal moleküllere bağlanan kinon yapısındaki bileşiklere kolayca dönüşebilmesiyle açıklanmaktadır (Baer ve ark 1948).

1.2. Timus

1.2.1. Timusun Histolojisi

Kanatlı hayvanlarda timus, boynun her iki tarafında, sulkus jugularis boyunca aralıklarla yerleşmiş olan çok sayıda loptan oluşur. Derialtı bağ dokusuna gömülmüş haldeki loplar, yassı-oval şekilli olup; boynun her bir tarafında yaklaşık 7'şer adettirler. Boynun her iki tarafında da üçüncü boyun omuru hizasından başlarlar ve aralıklarla göğüs boşluğundaki tiroit bezinin yakınına kadar devam ederler. Sağ taraftaki loblar organın sağ yarımını, sol taraftakiler ise sol yarımını oluştururlar. Her iki taraftaki lop sırası, N. vagus ve V. jugularisin boyun bölgesindeki seyrine uygun bir yerleşim tarzı izler (Hodges 1974).

Bezin her lobu, bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrilmiştir. Yer yer bölgede seyreden V. jugularis ve diğer büyük venlerle de temas halinde olan kapsülün dış bölümü, gevşek bağ dokusu ve yağ dokusundan oluşmaktadır. Kapsülün iç kısmını esas olarak kollagen türündeki bağ dokusu iplikleri oluştursa da, bölgede elastik ipliklere de rastlanmaktadır. Kapsülden ayrılarak lopların içine giren ince bağ dokusu bölmeleri lopları lopçuklara ayırmaktadır. Lopçukları besleyen kan damarları kesitlerine, çoğunlukla bağ dokusu bölmelerinin kapsülle birleştikleri bölgelerde rastlanmaktadır. Bu damarlardan ayrılan ince dallar bağ dokusu bölmelerinde seyrederek lopçuklara ulaşır (Hodges 1974).

Lopçuklarda korteks ve medulla kısımları ayırt edilirse de, bu organda korteks-medulla sınırı bursa Fabricii'deki kadar belirgin değildir. Korteks ve medulla stroması, retikulum hücrelerinin oluşturduğu bir hücre ağı ile bu hücreleri destekleyen retikulum ipliklerinin şekillendirdiği ağdan oluşan gözenekli bir yapı halindedir. Retikulum hücreleri, ince ve granüler tarzda dağılmış heterokromatin ile

bir veya iki çekirdekçiği olan yuvarlak, oval veya uzun oval bir çekirdeğe sahiptirler. Retikulum hücrelerinin oluşturduğu ağın (sinsityumun) gözeneklerini, lopçukların korteks bölümünde çoğunlukla küçük tip lenfositlerden oluşan bir lenfosit yığını doldurur. Lopçukların lenfositlerden oldukça zengin olan korteks kısımları, histolojik preparatlarda koyu bazofilik özellik gösterir (Hodges 1974).

Lopçukların medullaları kortekslerinden daha az lenfosit içerdiklerinden daha soluk boyanırlar. Bu bölgede lenfosit yoğunluğu az olduğundan, retikulum hücrelerinin çekirdekleri net olarak görülebilmektedir. Kanatlılarda timus lopçuklarının medullalarında memelilerdeki gibi yuvarlak şekilli ve kornifiye durumdaki konsentrik lamellerden oluşan Hassal cisimciklerine oldukça az sayıda rastlanmaktadır (Hodges 1974, Hashimoto ve Sugimura 1976, Sandıkçı ve Çelik 2000). Bu türde, yukarıdaki yapılara ek olarak Hassal cisimciklerinin diffüz tipi olarak da nitelenen ve retikulum hücrelerinin değişikliğe uğramalarıyla şekillenen kistik yapılar da gözlenmektedir. Bu yapıların oluşumu, medulladaki bazı retikulum hücrelerinin sitoplâzmalarında küçük veziküllerin şekillenmesiyle başlamakta; birbirleriyle kaynaşan veziküller hücrenin sitoplâzmasını tamamen kaplayan iri ve yuvarlak vakuolleri şekillendirmektedir. Birkaç vakuolün kaynaşması sonucu oldukça iri vakuoller ve kistik yapılar oluşmaktadır. Bu yapıların lümenleri genellikle eozinofilik bir maddeyle dolu durumdadır. Kistlerin duvarını ise epiteloid karakterdeki yassılmış ve uzamış retikulum hücreleri oluşturmaktadır. Kist içeriğinde sıklıkla dejenere olmamış lenfositler yanında dejenere olan lenfositlerin bazofilik çekirdeklerinin oluşturduğu, koyu bazofilik granül yığınları gibi hücresel artıklara da rastlanmaktadır. Bu morfolojik özellikleri nedeniyle kanatlı timusunun medulla kısımlarında sıklıkla rastlanan ve diffüz Hassal cisimcikleri olarak da nitelenen bu yapıların, dejenere olan retikulum hücrelerinden çok, lenfositlerin yıkımı esnasında şekillenen yapılar oldukları kabul edilmektedir (Hodges 1974).

Medulladaki epitel kökenli retikulum hücrelerinin çoğunluğu medullar kistlerle ilişkilidir. Kistlerin bazılarının lümenleri PAS pozitif materyal içerirken, bazı kistlerin lümenleri boştur. Büyük tip kistlerin şekilleri oldukça değişkendir ve kist lümeni, çok sayıda epitelyal retikulum hücresi tarafından çevrelenmiş durumdadır. Çoğu kistlerin lümenleri ise hücrelerin yıkımlanması sonucu arta kalan yapıları da içeren kolloidal veya granüler bir madde ile doldurulmuştur (Hashimoto ve Sugimura 1976).

1.2.2. Timusun Embriyonik Dönemdeki Gelişimi

Memeli ve kanatlıların her ikisinde de timus taslağı 3. ve 4. yutak ceplerinin endoderminden gelişir (Maskar 1976, Carlson 1981, Kelly ve ark 1984, Latshaw 1987). Endodermal epitelyum kökenli timus taslağına, lenfoid hücrelerin öncülleri olan iri bazofilik sitoplâzmalı, pretimik kök hücreler kan damarları yoluyla gelerek yerleşirler (Backman 1997). Kuluçkanın ileri evrelerinde, çoğalan hücrelerin oluşturduğu hücre kümeleri boğumlanarak lopları şekillendirirler (Maskar 1976). Sandıkçı ve Çelik (2000), kuluçkanın 7. gününde; organ taslağını oluşturan hücreler arasındaki iri-bazofilik hücrelerin sayısının arttığını, 10. günde küçük lopçukların şekillenmeye başladığını, 13. günde ise lopçuklarda korteks-medulla ayırımı yapılabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 13. günde medullada, olgun T lenfositlerine özgü bir sitoplazmik enzim olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi (Pruthi ve ark 1987, Maiti ve ark 1990) pozitivitesi gösteren hücrelere az sayıda rastlanmaktadır. Timusun gelişimi kuluçkadan çıkışı takip eden 9-11. günlerde tamamlanmış durumda olup, ANAE (+) hücrelere korteks-medulla sınırında ve özellikle de medullada rastlanmaktadır (Sandıkçı ve Çelik 2000).

1.2.3. Timusun İnvolüsyonu

Organın ağırlığında kuluçkadan çıkıştan sonraki 1-17. haftalar arasında tedrici bir artış gözlenmekte; on yedinci haftadan sonra ise belirgin bir düşüş meydana gelmektedir. Yaklaşık 23. haftada organın ağırlığı, 17. haftada ulaştığı maksimum ağırlığın yarısından daha azdır. Organın vücut ağırlığına oranı, kuluçkadan sonraki 10. haftada en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Erişkin hayvanlarda timus invole olduğunda ise lopların yerinde küçük kalıntılar halinde lenfoid doku gözlenmektedir (Hodges 1974).

Yumurtadan çıkışın 1. gününde, organın ağırlığı vücut ağırlığının % 0.13-0.22'si kadardır. On birinci haftaya kadar sürekli olarak artan organ ağırlığı, 3-11. haftalar arasında vücut ağırlığının % 0.31-0.43'ünü oluşturmaktadır. Bu dönemi takiben, 13. haftadan 22. haftaya kadarki dönemde organın ağırlığında belirgin bir düşüş görülmektedir. Nitekim yirmi ikinci haftadan sonra timus, vücut ağırlığının %0.02'sini oluşturmaktadır (Hashimoto ve Sugimura 1976).

1.3. Bursa Fabricii

1.3.1. Bursa Fabricii'nin Histolojisi

17. yüzyılın ilk yarısında Hieronymus Fabricius tarafından tanımlanan kese biçimindeki bu organ, bu araştırıcının adına izafeten "Bursa Fabricii (Bursa of Fabricius)" olarak isimlendirilmiştir. Kanatlı kloakasının dorsalinde yer alan bursa Fabricii, asıl kese, boyun ve kanal bölümlerinden oluşmaktadır (Kocaöz ve ark 1997).

Histolojik olarak gelişimini tamamlamış olan bursa Fabricii'de içten dışa doğru tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza katmanları ayırt edilir. Organa özgü lenf folikülleri, tunika mukoza katmanının lümene doğru yapmış olduğu boyuna kıvrımlarda (plika) lokalize olmuşlardır. Tunika mukoza epitelinde, foliküller arası bölgede yalancı çok katlı prizmatik epitel (interfoliküler epitel, IFE) ile foliküllerin üzerini örten bölgede bazal membranı bulunmayan, bol miktarda lenfosit içeren özelleşmiş bir epitelyum (Folikül ilişkili epitelyum, FAE) olmak üzere iki farklı epitel ayırt edilir (Lupetti ve ark 1990, Olah ve Glick 1992).

Organın embriyonik gelişmesi üzerinde yapılan çalışmalarda (Michael ve Ratcliffe 1985, Olah ve ark 1986, Lupetti ve ark 1990, Kocaöz ve ark 1997), organın asıl kese kısmı ile boyun kısmı epitelinin son bağırsak endoderminden, kanal kısmı epitelinin ektodermden, lenfoid hücrelerinin ise mezodermden köken aldığı bildirilmiştir.

Organa ait lenf foliküllerinde korteks ve medulla olmak üzere iki bölge ayırt edilir. Rutin boyalarla daha koyu gözlenen korteks ile hücreden fakir olması nedeniyle daha açık gözlenen medulla arasında İFE'nin devamı olan kortiko-medullar sınır hücreleri katmanı (KMSH) dikkati çekmektedir (Kocaöz ve ark 1997). Primer lenfoid bir organ olan bursa Fabricii kanatlılarda B-lenfositlerin yapımından sorumludur.

Organın histolojik gelişmesi, hayvan kuluçkadan çıkıştan önce hemen hemen tamamlanmış durumdadır (Lupetti ve ark 1990, Shiojiri ve Takahishi 1991). Kuluçkadan çıkışı takip eden ilk haftalarda, organda bulunan ve histolojik gelişmeleri tamamlanmış olan lenf folikülleri irileşirler. Bu dönemde organda yeni lenf folikülü şekillenmesi gerçekleşmemektedir. Gelişmesi tamamlandığında organın

lamina propriyasında yaklaşık on bin adet lenf folikülünün bulunduğu bildirilmiştir (Michael ve Ratcliffe 1985).

Keşfini izleyen yıllarda bursa Fabricii'nin kan hücreleri yapımı fonksiyonu üzerinde durulmuştur. Embriyonik gelişimi esnasında organda eritropoietik ve granülopoietik odaklara rastlanmaktadır. Organın, B-lenfositlerinin yapıldığı merkezi lenfoid organ olarak fonksiyon gördüğü, bursektomi çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Glick 1977, Glick ve Olah 1982). Bursa Fabricii'de B-lenfosit yapımı, organın involüsyonu başlayıncaya kadar sürmektedir (Michael ve Ratcliffe 1985).

1.3.2. Bursa Fabricii'nin Embriyonik Gelişimi

Hassa (1955), organ taslağının embriyonik gelişmesinin, kloakaya açılan son bağırsak duvarının epitel katmanında oluşan kalınlaşmayla başladığını; tek boşluklu organ taslağının bu hücreler arasında oluşan vakuollerin birleşmesiyle kuluçkanın yedinci gününde şekillendiğini tespit etmiştir. Organ taslağı, embriyonik dönemin 3-5. günleri arasında, kloakanın dorsal duvarında dışa doğru çıkıntı oluşturan bir epitel tomurcuğu halinde görülür (Olah ve Glick 1992, Olah ve Glick 1995). Yedinci güne kadar kloakal plağın endodermal hücreleri arasındaki küçük vakuoller birleşerek genişler ve organ taslağının merkezi lümenini oluştururlar. Bu dönemde düzgün bir şekilde seyreden epitelle örtülen kese lümeni, membrana kloakayla amniyon kesesi boşluğundan ayrılmaktadır (Michael ve Ratcliffe 1985).

Organa özgü plikaların ilk önce 10. günde gelişmeye başladıkları ve 12. Günde gelişmelerinin tamamlandığı bildirilmektedir (Olah ve Glick 1992, Olah ve Glick 1995).

Bursa Fabricii'deki lenf folikülleri organ taslağının merkezi lümenini örten endodermal epitelin değişikliğe uğramasıyla değil, organ taslağının mezenkimine göçle gelen kök hücrelerin, epitelin bazal yüzüne göç etmeleriyle başlayan folikül şekillenmesi olayları sonucunda, hem epitel ve hem de mezenkimal hücrelerin katılımıyla oluşmaktadırlar (Shiojiri ve Takahaski 1991, Kocaöz ve ark 1997). Organda lenf folikülü gelişimi; kuluçkanın onuncu gününde, başlangıçta organ mezenkimindeki kan damarlarının lümenlerinde ve epitele uzak bölgelerdeki mezenşim içinde gözlenen iri bazofilik hücrelerin epitelin bazal yüzüne ulaşmalarıyla başlar (Glick 1956, Valinski ve ark 1981, Lupetti ve ark 1990, Shiojiri ve Takahashi

1991) ve bu dönemi takip eden günlerde epitelde lümene doğru çıkıntı yapan tomurcuklar şekillenir (Michael ve Ratcliffe 1985). Yapılan embriyolojik çalışmalarda kuluçkanın 7 ve 8. günlerinde kese biçimindeki bursa Fabricii'nin dorsal mezenkiminde, ileriki dönemlerde ise epitelyum örtüsünün bazal yüzünde iri bazofilik hücrelerin gözlendiği bildirilmektedir (Glick 1956, Lupetti ve ark 1990, Shiojiri ve Takahashi 1991). Aynı hücrelere bu dönemde, mezenkimdeki kan damarlarının lümenlerinde de sıklıkla rastlanmaktadır. Organın lümenini örten endodermal epitelin bazal yüzüne ulaşan bazofilik hücreler, 11. günde yer yer gruplar oluşturmakta ve hızla çoğalmaktadır (Lupetti ve ark 1990, Le Douarin ve ark 1984). Bu indiferensiye mezenkimal hücrelerin epitel dokuda oluşturduğu basınç nedeniyle epitelin, bazofilik hücre gruplarının bulunduğu bölgelerinde lümene doğru tomurcuklar şekillenmektedir. Tomurcuğun merkezindeki mezenkimal hücre topluluğu, endodermal epitel hücreleriyle tamamen kuşatılmaktadır. Gelişme ilerledikçe, şekillenen bu primordiyal foliküller mezenkime invagine olurlar (Saifuddin ve ark 1988, Lupetti ve ark 1990, McLelland 1990). Tomurcuğun yüzey hücreleri uzayıp-gerilme sonucu dejenere olurlar ve bu hücrelerin yerine, diferensiye olarak epiteloid karakter kazanan mezenkimal hücreler geçer. Gelişmekte olan foliküllerin lümene bakan yüzlerini örten, sitoplâzmaları daha soluk boyanan bu hücreler ileriki dönemlerde bursa Fabricii'ye özgü histolojik yapıya sahip olan lenf foliküllerinin lümene bakan yüzlerini örten FAE hücrelerini oluştururlar (Glick 1956, Lupetti ve ark 1990, Shiojiri ve Takahashi 1991). Organa özgü lenf foliküllerinin şekillenmeleri tamamlandığında lümene bakan yüzlerini FAE örterken; foliküller arası bölgeleri de İFE örtmektedir (Glick 1985).

Kuluçkanın 14-15. günlerinde bursa Fabricii'deki primordial lenf foliküllerinde lenfoblastların görüldüğü ve bu lenfoblastların zamanla büyük, orta ve küçük lenfositlere farklılaştığı bildirilmiştir (Bockman ve Cooper 1973). Kuluçkanın 17. gününe kadarki embriyonik evrede, organdaki lenf foliküllerinin şekillenmeleri hemen hemen tamamlanmıştır. Bu dönemde ve daha sonrasında organdaki lenf folikülleri iyi gelişmiş bir medullaya ve dar bir kortekse sahiptir (Lupetti ve ark 1990, Olah ve Glick 1992). Foliküllerin korteksleri; kuluçkadan çıkıştan sonra, medulada yapılan lenfoid hücrelerin perifer lenfoid organlara göç etmelerinden önce foliküllerin korteks bölgelerine göç etmeleri sonucu belirgin bir şekilde genişlemektedir (Olah ve Glick 1992). Bursa Fabricii kuluçkadan çıkışı takip eden

ilk birkaç gün içinde normal histolojik gelişimini tamamlamış durumdadır (Hirota ve ark 1976, Lupetti ve ark 1990, Kocaöz ve ark 1997).

1.3.3. Bursa Fabricii'nin İnvolüsyonu

Bursa Fabricii'nin tavuklarda ortalama maksimum büyüklüğe ulaşma süresi kuluçkadan çıktıktan sonraki ilk 4 aydır (Glick 1956, Hodges 1974). Tüm kanatlı türlerinde, seksüel olgunlukla birlikte organda involüsyon başlar. Tavuklarda organın involüsyona dair mikroskobik değişiklikler, hayvan yaklaşık olarak 8-12 haftalıkken başlar ve 20 haftalığa kadar devam eder. Yirmi haftalıkken organın ağırlığı yaklaşık olarak 0,5 gramdır ve erginlerde nodüler bir kalıntı halindedir (McLelland 1990).

İnvolüsyon başlangıcında ortaya çıkan ilk histolojik değişiklikler, İFE'de derin çöküntülerin şekillenmesi ve bu bölgede kadeh hücrelerinin sayısının artması, lenf foliküllerinin medulalarındaki bazı hücrelerin dejenere olarak erimeleri sonucu intrafoliküler kistlerin şekillenmesidir (Kocaöz ve ark 1997). Bu kistler foliküllerin dip kısmında, kortiko-medular sınır hücrelerine yakın bölgelerde, sitoplâzmaları soluk ve homojen boyanan, aralarında geniş boşluklar bulunan ve mukoid dejenerasyona uğramış olan hücre topluluklarının bulundukları bölgelerde şekillenmektedir (Kocaöz ve ark 1997).

Başlangıçta küçük olan kistler, involüsyon ilerledikçe genişler ve kist lümenini örten kübik epitel hücreleri gittikçe prizmatik biçim alırlar (Kocaöz ve ark 1997). Foliküllerde şekillenen kistlerin benzerlerinin aynı zamanda FAE'de de gözlendiği, IFE'deki kadeh hücrelerinin sayılarının artışına bağlı olarak epitel yüzeyinin kalın bir mukus tabakasıyla örtüldüğü ve bölge epitelinde derin girintilerin şekillendiği de bildirilmiştir (Ciriaco ve ark 2003).

İnvolüsyonla ilgili değişikliklerin başlamasından sonraki 2-4 hafta içinde, şekillenen kistler genişlemekte ve folikül medulasının lümene bakan yüzünü örten FAE'nin de dejenerasyonu ve dökülmesiyle kist içeriği organın merkezi lümenine boşalmaktadır. Foliküler kistlerin lümene açılmasıyla oluşan tubuler oluşumların, organın merkezi lümenine multitubuler bir görünüm kazandırdığı bildirilmiştir (Kocaöz ve ark 1997). İnvolüsyonun son aşamasında ise foliküllerin histolojik organizasyonu tamamen ortadan kalkmakta, organın büyük bir kısmını fibröz bağ dokusu kaplamaktadır (Kocaöz ve ark 1997). İnvolüsyonu tamamlanan bursa

Fabricii'nin bağ dokusu içinde yer yer lenfosit infiltrasyon alanları bulunmakta ve organ bir süre daha sekonder lenfoid organ olarak fonksiyon görmektedir.

1.3.4. Bursa Fabrici'nin Fonksiyonları

İlk defa 17. yüzyılda Hieronymus Fabricius tarafından tanımlanmasına rağmen, kanatlı kloakal bursasının fonksiyonu yaklaşık 40 yıl öncesine kadar bir sır olarak kalmıştır. Bursa Fabricii'nin cerrahi yolla uzaklaştırılmasını (bursektomi) takiben tavukların, aldıkları antijenlere karşı normal hayvanlardan daha düşük antikor yanıtı verdiği dikkati çekmiştir. Daha sonra yapılan detaylı çalışmalar sonucunda bursa Fabricii'nin kanatlılarda B-lenfositlerin olgunlaşıp, immün yetenek (immüno kompetens) kazandıkları merkezi bir lenfoid organ olduğu anlaşılmıştır (Le Douarin ve ark 1990).

Son yıllarda yapılan araştırmalarla kan hücresi tiplerinin hepsinin tek bir ana hücreden (kök hücre, stem cell) meydana geldikleri ortaya konmuştur. Bu kök hücreye "hemositoblast" adı verilir. Her tip kan hücresine farklılaşabilen (multipotent) hemositoblastlar, intrauterin yaşamda vitellüs kesesi duvarındaki mezenkim hücrelerinden diferensiye olup, önce karaciğere, sonra diğer kan yapan organlara gidip yerleşir ve oralarda bölünüp çoğalarak değişik türlerdeki kan hücrelerini meydana getirirler. Postnatal yaşamda ise multipotent hemositoblastlar sadece kırmızı kemik iliğinde bulunurlar. Tek tip kan hücresi yönünde farklılaşmak üzere koşullanmış olan ikincil hemositoblastlar ise "progenitor" hücreler adını alır. Kanatlılarda prebursal kök hücreler bursa Fabricii'ye yerleşir ve bölünüp çoğalarak inaktif B-lenfositlere farklılaşırlar (Sağlam ve ark 2001).

Bursa Fabricii'ye yerleşen prebursal kök hücreler, timustaki T-lenfosit olgunlaşmasına benzer şekilde bursa Fabriciide bursin, bursapoietin ve diğer sitokinlerin yardımıyla farklılaşarak yeni yüzey molekülleri kazanır ve olgunlaşırlar (Diker 1998). Pozitif ve negatif hücre seleksiyonu bu organda da gerçekleşir. Yabancı antijenlere yanıt verecek B-lenfositlerin çoğalması desteklenirken (pozitif seleksiyon), vücudun kendi antijenlerine karşı yanıt oluşturacak B-lenfositler apoptozisle ölürler (negatif seleksiyon). B-lenfositlerin ancak %5'i organ dışına çıkarak sekonder lenfoid organlara yerleşir. Bursa Fabricii'den ayrılan olgun B-lenfositler kanatlılarda dalak ve diğer lenfoid organlara (sekal tonsiller, Peyer

plakları, Harder bezi), su kuşlarında ise lenf düğümleri, dalak ve diğer lenfoid doku ve organlara giderek buralara yerleşirler (Diker 1998). Perifer lenfoid doku ve organlara yerleşen inaktif B-lenfositlerin aktivasyonu için antijen ve T-hücre yardımı gerekmektedir. Aktive olan B-lenfositler plazma hücrelerine farklılaşarak antikor üretimini başlatır (Ratcliffe 1985).

Kuluçkadan çıkıştan sonra bursa Fabriciideki lenf folikülleri arasındaki interfoliküler alanlarda çok sayıda plazma hücresine rastlanmaktadır. Bu plazma hücrelerinin, FAE'deki antijen sunan hücreler sayesinde organ lümeninden kontrollü olarak alınan antijenlere karşı spesifik antikorları ürettikleri bilinmektedir. Bu bulgular, organın her ne kadar primer lenfoid organ görevi yapsa da antikor oluşturarak perifer lenfoid sisteme destek de sağladığını göstermektedir. Bursa Fabricii asıl olarak lenfoid bir organ olmakla birlikte, embriyonik dönem ve kuluçkadan çıkıştan sonraki ilk bir kaç gün boyunca eritrosit ve granülosit yapımını da gerçekleştirir (Lupetti ve ark 1990, Shiojiri ve Takahashi 1991).

1.4. Asit Fosfataz Enzimi

Asit fosfataz (ACP-az) enzimi, miyelositler, polimorf nükleer lökositler (PMNL), lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulcukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir (Catowsky 1981). Özellikle makrofajlar çok güçlü ACP-az aktivitesi gösterirler (Li ve ark 1972). Basso ve ark (1980), insan timositlerince erken fötal dönemde kazanılan ACP-az pozitivitesinin, doğumdan sonra da perifer kan T-lenfositlerinde güçlü bir şekilde gözlendiğini bildirmişlerdir.

Kaplow ve Burstone (1964), insan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitivitesi, monositlerin ise soluk ve sitoplâzmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan diffüz pozitivite göterdiklerini belirlemişlerdir. Enzimin memelilerde T lenfositlere spesifik olduğu bildirilirken (Yang ve ark 1982), kanatlılarda B-lenfositler için spesifik olduğu ileri sürülmektedir (Graczyk 1994). Yang ve ark (1982)'nın neoplastik ve non-neoplastik insan lenf yumrularında yapmış oldukları bir çalışmada, ACP-az için biri hem lenf yumrusu ve hem de kan frotilerindeki T-lenfositlerinde gözlenen globüler pozitivite

ile diğeri sadece lenf yumrularındaki T-lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitivite tiplerini gözlemişlerdir.

Kobay, fare ve ratların timositlerinde, bir ya da iri birkaç granül halinde veya sitoplâzmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüller tarzında ACP-az pozitivitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise diffüz nongranüler pozitivite gözlenmektedir (Tamaoki ve Essner 1969, Seymour ve ark 1978). Tavuklarda T lenfositlerin ACP-az pozitivitesi konusunda farklı görüşler vardır. Bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin korteks ve medullalarıyla timus'un hem korteks ve hem de medullasında ACP-az içeren lenfositlerin bulunduğunu; bu nedenle de söz konusu enzimin tavuk T-lenfositlerine özgü olmadığını bildirmekte ve bu enzim pozivitesinin, kanatlı lenfoid dokularının gelişimlerinin incelenmesinde önemli bir kriter olabileceğini de ileri sürmektedirler (Glick 1988, Moriya ve Ichikawa 1989). Bazı araştırıcılar (Graczyk 1984, Graczyk 1987, Slowik ve ark 1990) ise neo-natal dönemde bursektomize ettikleri civcivlerin kan dokuları ile dalaklarındaki lenf foliküllerinin germinal merkezlerinde (GC'ler) ACP-az pozitif lenfosit oranlarında önemli düşüşler meydana geldiğini bildirmektedir. Sonuç olarak, ACP-az enziminin kanatlı olgun B lenfositlerine özgü olduğu kabul edilmektedir (Slowik ve ark 1990, Graczyk 1994, Sur ve Celik 2003).

1.5. Alfa-naftil Asetat Esteraz Enzimi

Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi lizozomal bir enzimdir (Knowles ve Holck 1978a, Zicca ve ark 1981). Pratikte, bazı türlerin gerek doku kesitleri ve gerekse de perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde yararlanılan ANAE (Mueller ve ark 1975, Ramos ve ark 1992), T-lenfosit olgunlaşması sırasında son dönemde kazanılan bir enzimdir (Basso ve ark 1980). Çelik ve ark (1992)'nın sığır fetüslerinde yapmış oldukları çalışmada, fetüslerin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlanmış, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte ANAE pozitif lenfosit oranının da arttığı tespit edilmiştir. Bu enzimin, öteki esteraz grubu enzimler gibi, aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonlarıyla makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır (Mueller ve ark 1975). Başta insan olmak üzere (Çelik ve ark 1991), sığır (Kajikawa ve ark 1983), tavuk (Maiti ve ark 1990), köpek (Wulff ve ark 1981) ve farede (Mueller ve ark

1975) T-lenfositlerin histolojik ayrımında yararlanılan bir enzimdir. ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde; ilki, bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tarzındaki (Dot Like-Positivity) T-lenfositlere özgü olan pozitivite (Higgy ve ark 1977, Wulff ve ark 1981, Zicca ve ark 1981, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991), diğeri ise "Null Cells" olarak da adlandırılan hücrelere özgü olduğu ifade edilen (Higgy ve ark 1977) ince-granüler (Fine Granular Positivity Pattern) pozitivitedir. Monosit ve makrofajlarda ise sitoplâzmada diffüz ve güçlü bir pozitivite gözlenmektedir (Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991).

ANAE pozitif hücrelerin, lenf yumrularında parakortikal (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981) ve interfoliküler bölgelerde, tonsillalarda interfoliküler bölgelerde (Knowles ve Holck 1978b), dalakta arteriya sentralis'i saran periarteriyoler lenfoid kılıfta (Mueller ve ark 1975) ve timusun medulla bölgesinde lokalize olmaktadır. Lenf yumruları, dalak ve tonsillaların lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki lenfositler ile kortikal timositler ANAE negatif reaksiyon vermektedir (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981). Farklı türlerin perifer kanındaki ANAE pozitif lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermekte; insanda %69-%75 (Ranki 1978, Çelik ve ark 1991), köpeklerde %56-%78 (Wulff ve ark 1981), tavuklarda %35 (Pruthi ve ark 1987) ve sığırlarda ise %47.7 (Kajikawa ve ark 1983) kadardır.

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında kuluçkalık yumurtaların hava kamarasına enjekte edilen farklı dozlardaki Sunset Yellow FCF'nin (E110), tavuk embriyolarında timus ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Yumurta Materyali

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun onayıyla (2013/044) gerçekleştirildi. Çalışmada, Bursa Hastavuk İşletmesinden temin edilen Ross 508 hattı broyler anaçlardan elde edilen; 250 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

Yumurtalar m^3 başına 130 ml 40%'lık formaldehit solüsyonuna atılan 80 g potasyum permanganat karışımıyla fumigasyona tabi tutularak dezenfekte edildi. Enjeksiyon işlemlerinden önce tüm yumurtalar hassas terazi (Sartorius, PT 120, Germany) ile tartıldı ve takiben küt uçları %96'lık etil alkolle silindi. Tüm enjeksiyonlar hava kamarası yoluyla ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Delikler özel yumurta delicisi ile açıldı ve enjeksiyonu takiben hemen sıvı parafinle kapatıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikro pipet ile (Sealpette, Jencons, Finland) gerçekleştirildi. Kuluçka işlemleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan 1,000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Veyisoğlu, İstanbul, Türkiye) optimum koşullarda (37.8ºC sıcaklık ve %65 nispi nem) gerçekleştirildi. Yumurtalar 2 saatte bir kez çevrildi.

2.1.2. Sunset Yellow FCF (E110)

Çalışmada, kristalize haldeki boya oranı %90 (465224-25G, Sigma-Aldrich, USA) olan Sunset Yellow FCF (E110) kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1 Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Hazırlanması

Kristalize haldeki saf Sunset Yellow FCF (E110) standardı, steril distile su içinde çözdürülmek suretiyle, 10 µg/ml konsantrasyonunda Sunset Yellow FCF (E110) stok solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon, çalışmada kullanılacak olan her bir konsantrasyon grubu için gerekli olan Sunset Yellow FCF (E110) içerecek şekilde falcon tüplere konuldu ve tüpler alüminyum folyoya sarılarak, kullanıncaya kadar buzdolabında +4^{o}C'de muhafaza edildi. Kullanımda önce solüsyonlar 0,2 µm'lik selüloz membran filtreden (WWR International, USA) geçirildi.

2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Sunset Yellow FCF (E110) Solüsyonlarının Yumurtalara Verilmesi

Bu amaçla 250 yumurta, her birinde 50 yumurta bulunan 5 gruba ayrıldı ve gruplara aşağıdaki çizelgede açıklanan işlemler uygulandı (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar n=50	**Yumurtalara Uygulanan İşlem**
Kontrol 1 grubu	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Kontrol 2 grubu	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacmindeki distile su enjekte edildi.
Deney 1 grubu (100 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacmindeki 100 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.
Deney 2 grubu (500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacmindeki 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.
Deney 3 grubu (1000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grup)	Yumurtaların hava kamarasına 20 µL hacmindeki 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) içeren test solüsyonu enjekte edildi.

2.2.3. Doku Örneklerinin Alınması

Kuluçkanın 11, 15, 18 ve 21. günlerinde kontrol gruplarından rastgele seçilen 5'er yumurta, deney gruplarından ise 10'ar yumurta açılarak doku örnekleri alındı.

Yapılan diseksiyonla embriyolardan timus ve bursa Fabricii dokusu örnekleri alındı.Her doku örneği üç parçaya ayrılarak; bir parça%10'luk tamponlu formal-salin (0,1 M, pH 7.4) diğer parçalarda aşağıda belirtilen ve her enzim için ayrı olarak hazırlanan tespit sıvılarında 24 saat süreyle tespit edildi. Bu amaçla alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi için +4°C'deki formol-sükroz solüsyonu (Knowles ve Holck 1978a), asit fosfataz (ACP-az) enzimi (Barka ve Anderson 1972) için formol-

kalsiyum solüsyonu hazırlandı. Tespiti takiben +4°C'deki Holt solüsyonuna aktarılan doku örnekleri bu solüsyonda 22 saat bekletildi. Bu doku örneklerinden dondurma mikrotomunda (Slee London) alınan 12 µm kalınlığında kesitler, önceden formol-jelâtin ile muamele edilmiş olan lamlara çekilerek oda sıcaklığında (20°C'de) 30 dakika süreyle kurutuldu.

Tamponlu formal-salinde tespit edilen doku örnekleri ise rutin histoteknik uygulanarak yıkama, dehidrasyon, şeffaflandırma, parlatma işlemlerini takiben sert parafinle bloklandı. Hazırlanan bloklardan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitlerin bir kısmı Crossmon'un triple (Culling ve ark 1985) ve bir kısmı da Pappenheim'in panoptik boyama yöntemleriyle (Konuk 1981) boyanarak ışık mikroskobik incelemeler için preparatlar hazırlandı.

Parafinde bloklanan kesitlerden hazırlanan preparatlarda organların embriyonik gelişimi histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle değerlendirildi.

2.2.4. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Demonstrasyonu

Bu amaçla, pH'sı 5.0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0.8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, N-8505-Sigma, USA) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2.4 ml %4'lük sodyum nitrit (S-3421, Merck, Germany) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (P- 3750, Merck, Germany) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesi sonucunda elde edilen 4.8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5.8'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde doku kesitleri kontrollü sürelerde bekletildi.

Enzimatik reaksiyon ürünü olan kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı (Maiti ve ark 1990).

2.2.5. Asit Fosfataz (ACP-Az) Demonstrasyonu

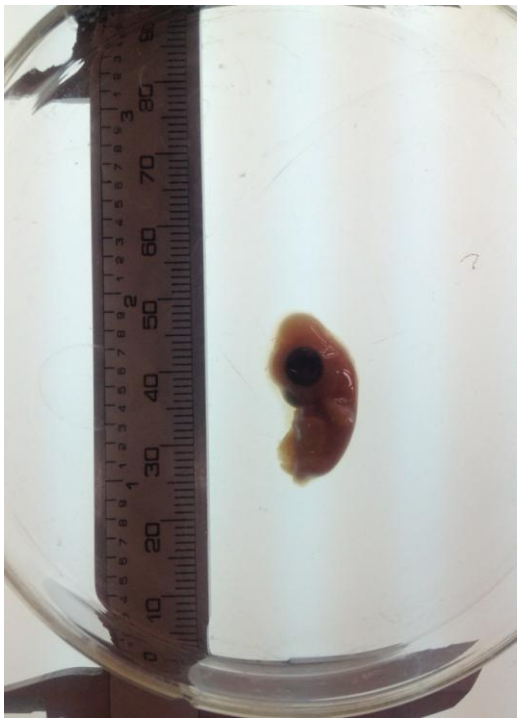
Bu amaçla, pH'sı 5.0 olan Michaelis'in Veronal-asetat tampon solüsyonuyla karıştırılan substrat olarak 1 ml N,N-dimetilformamid içerisinde çözdürülmüş 10 mg Naphthol AS-BI fosfat (N-2125, Sigma, USA) kullanıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu ve 13 ml distile su karıştırıldıktan sonra 1.6 ml hekzazotize edilmiş (0.8 ml pararozanilin, 0.8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklendi. Karışımın son pH'sı 1 N NaOH solüsyonu ile 5.0'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri oda sıcaklığında 1 saat, doku kesitleri kontrollü bir şekilde bekletildi. Hücre sitoplazmasında spesifik kırmızı-pembe granüllerin oluşumunun ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi. Üç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-greenle çekirdek boyası uygulandı (Goldberg ve Barka 1962).

3. BULGULAR

3.1. Makroskopik Bulgular ve Embriyonik Ölüm Oranları

Çalışmada kullanılan 250 adet yumurtanın toplam 230 adedi fertil olup, ortalama infertilite %8 olarak tespit edildi. Embriyonik ölüm oranlarının belirlenmesinde yalnızca embriyo içeren yumurta sayıları esas alındı.

Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarıyla, hava kamarasına 100 ng ve 500 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplardaki embriyoların Hamburger-Hamilton skalasına (1951) uygun gelişme evreleri gösterdikleri halde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen yumurtalardan elde edilen bazı embriyolarda embriyonik gelişme geriliği (Şekil 3.1) ve karın duvarının kapanmaması sonucu iç organların dışarıda olduğu kongenital anomali (ectopia viscera) gözlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. 500 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan kuluçkanın on beşinci günündeki gelişme geriliği olan bir embriyo görülmekte.



Şekil 3.2. 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan kuluçkanın on beşinci günündeki karın duvarının kapanmaması sonucu gelişen ektopiya visceralı bir embriyo görülmekte.

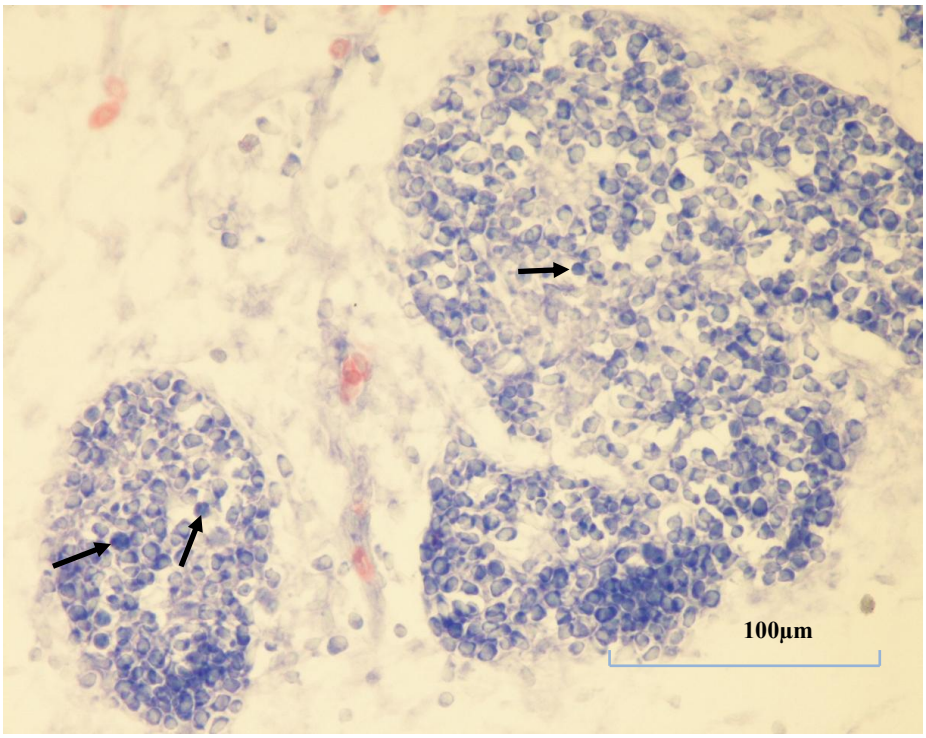
3.2. Kontrol ve Deney Gruplarında Timusun Embriyonik Gelişimi

3.2.1. Kuluçkanın On Birinci Günü

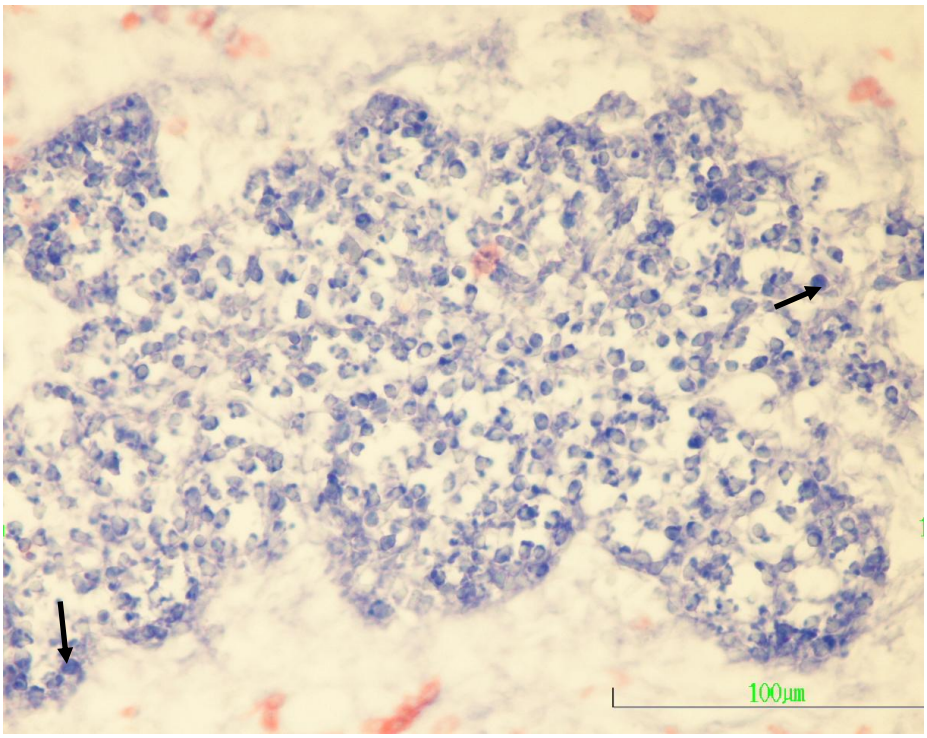
Kontrol gruplarında timus taslağını oluşturan gelişmekte olan lop taslaklarının, geniş mezenkimal alanlarla ayrıldıkları dikkati çekti. Bu mezenşimal alanlarda kan damarları ve psödoeozinofillerin lokalize oldukları gözlendi. Kan damarları lopçukların içine kadar sokulmuş durumdaydı. Küçük lenfosit morfolojisine sahip hücrelere lopçukların içinde ve lopçuklar arasındaki mezenşimde sıklıkla rastlandı (Şekil 3.3).

Deney gruplarında lop gelişiminin oldukça geri olduğu ve gelişme geriliğinin özellikle 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptaki embriyoların timuslarında daha belirgin olduğu ve lop taslaklarının daha küçük olduğu dikkati çekti (Şekil 3.4). Deney gruplarında 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grubun gelişmekte olan timus lobu taslaklarının merkezi bölgelerindeki vaskülarizasyon daha zayıftı. Lenfosit morfolojisine sahip hücre sayısının verilen doz arttıkça azaldığı dikkati çekti.

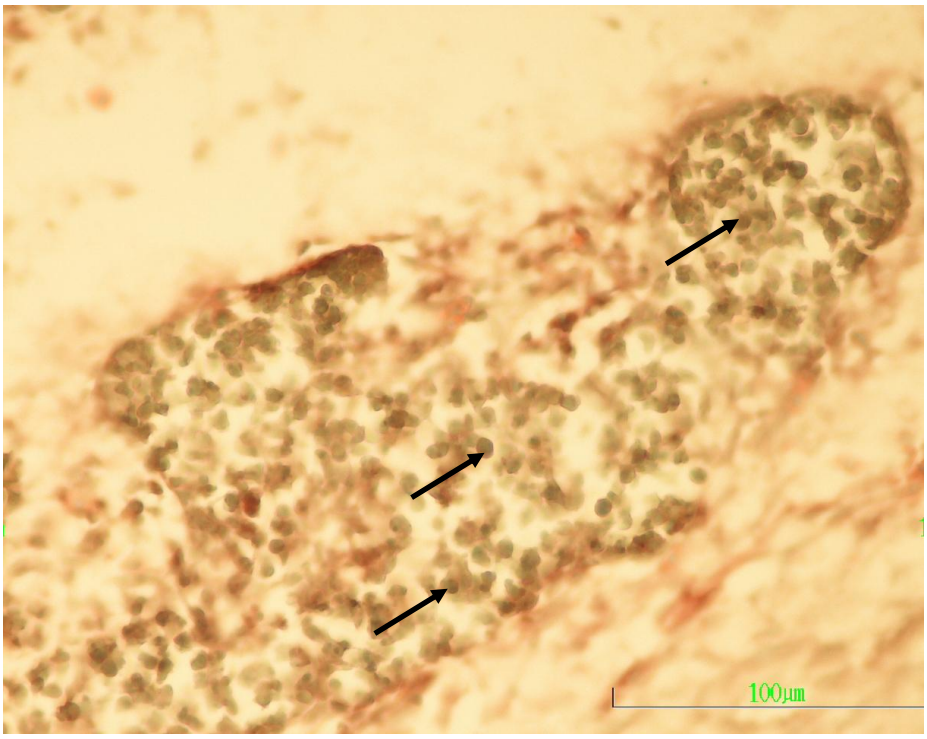
Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozivitesi gösteren ve lenfosit morfolojisine sahip olan hücrelere bu döneme ait timus dokusu örneklerinde rastlandı. Kontrol gruplarıyla deney gruplarından 100 ng/yumurta ve 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplar arasında enzim pozitivesi açısından belirgin fark tespit edilmemekle birlikte, 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grubun timus kesitlerinde tipik ANAE-pozitif hücre gözlenmedi (Şekil 3.5).



Şekil 3.3. Kuluçkanın on birinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. Oklar: Lenfosit morfolojisine sahip hücreler. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm



Şekil 3.4. Kuluçkanın on birinci gününde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. Oklar: Lenfosit morfolojisine sahip hücreler. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



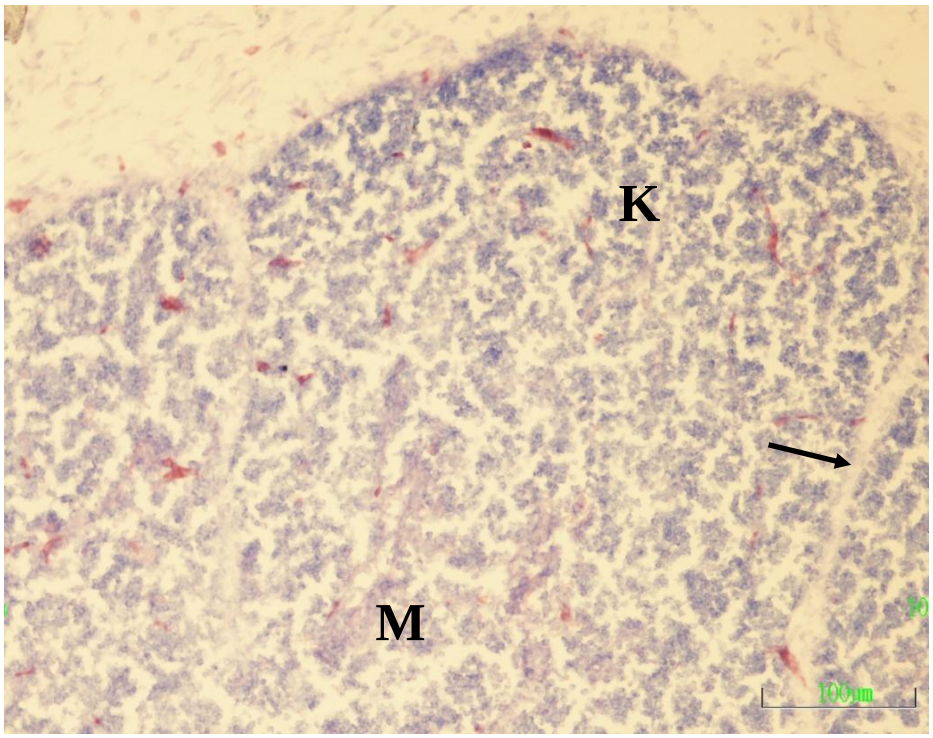
Şekil 3.5. Kuluçkanın on birinci gününde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. Oklar: Lenfosit morfolojisine sahip hücreler. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

3.2.2. Kuluçkanın On Beşinci Günü

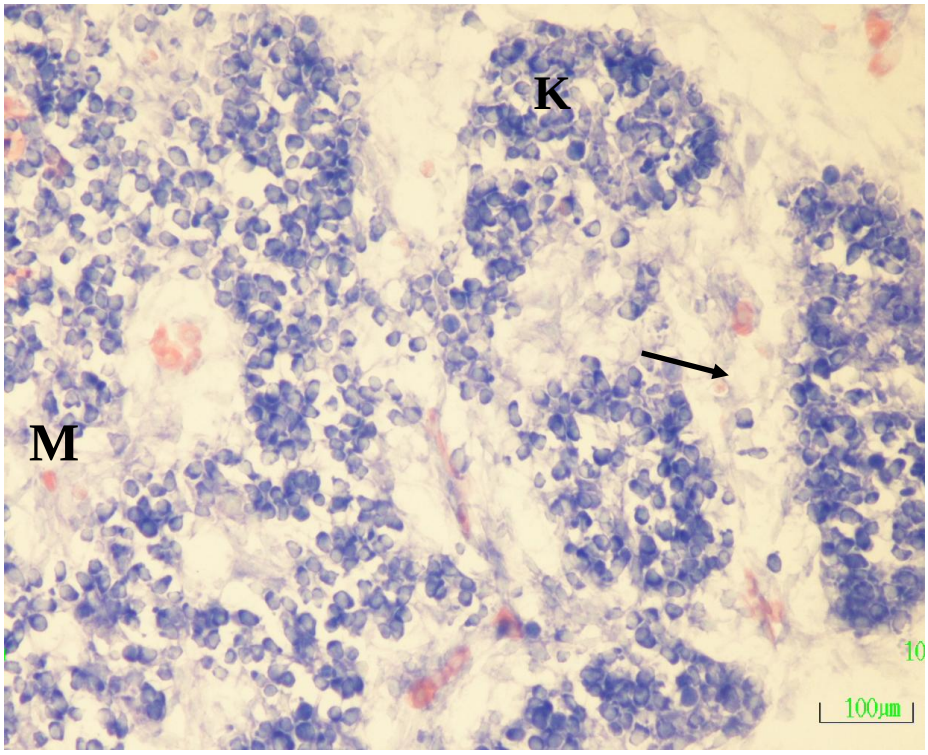
Kuluçkanın on beşinci gününde, timus loplarında korteks ve medulla bölgeleri belirgin olarak ayrılmakta ve hücreden zengin olduğundan koyu boyanan kortekste çoğunlukla küçük tip lenfositler bulunmaktaydı (Şekil 3.6). Medullada ise eozinofilik granüllere sahip psödoeozinofilik hücre infiltrasyonu göze çarptı. İnterlobüler bağ dokusunda geniş kan damarları kesitleri yanında az sayıda lenfosite rastlandı.

Deney gruplarından özellikle 500 ng ve 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplardaki embriyoların timus taslaklarında ortaya çıkan belirgin gelişme geriliğinin bir sonucu olarak; loplar kontrol grubundakinden belirgin biçimde daha küçüktü ve korteks-medulla ayırımı da daha az belirgindi (Şekil 3.7).

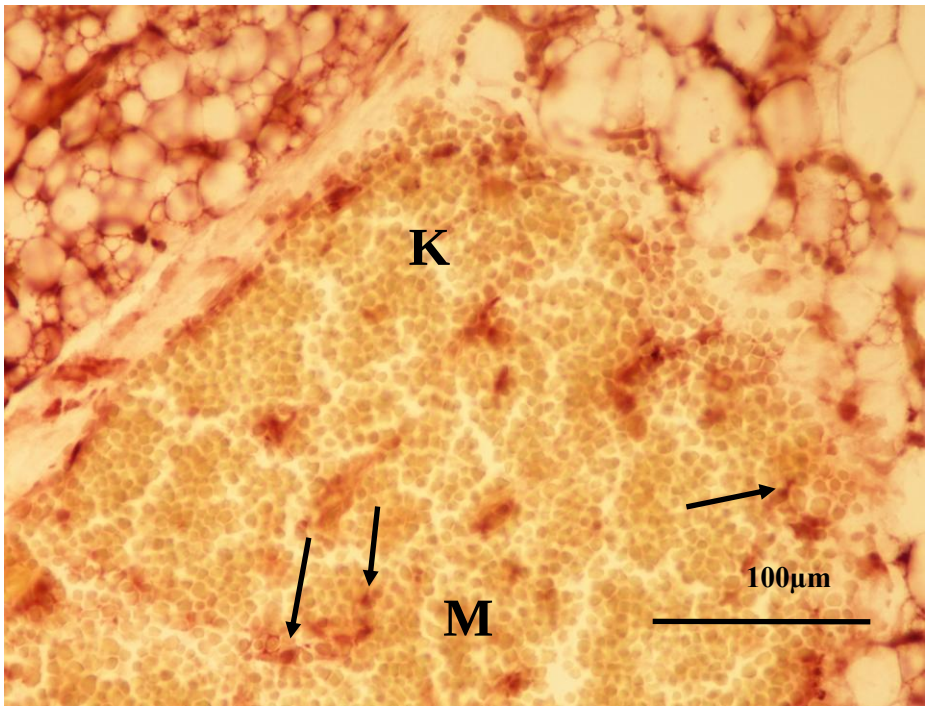
Bu dönemde ANAE pozitif lenfositlere lopların merkezi bölgelerinde sıklıkla rastlandı. Timus kesitlerinde kontrol gruplarıyla deney gruplarının ANAE-pozitif hücre yoğunlukları arasında belirgin fark gözlenmedi (Şekil 3.8).



Şekil 3.6. Kuluçkanın on beşinci gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Ok) İnterlobular mezenşim. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



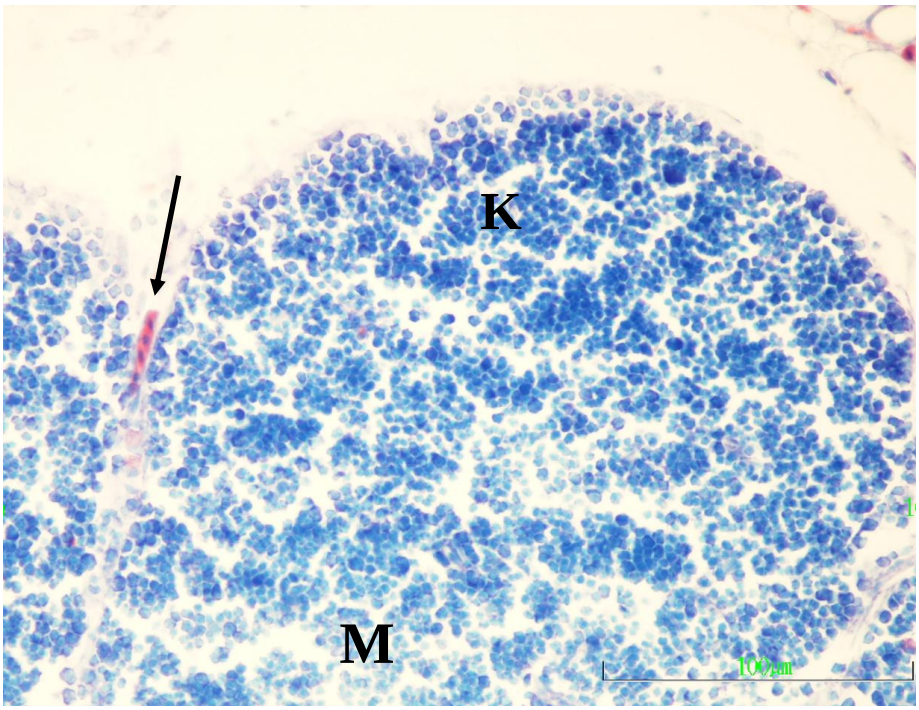
Şekil 3.7. Kuluçkanın on beşinci gününde, 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Ok) İnterlobular mezenşim. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



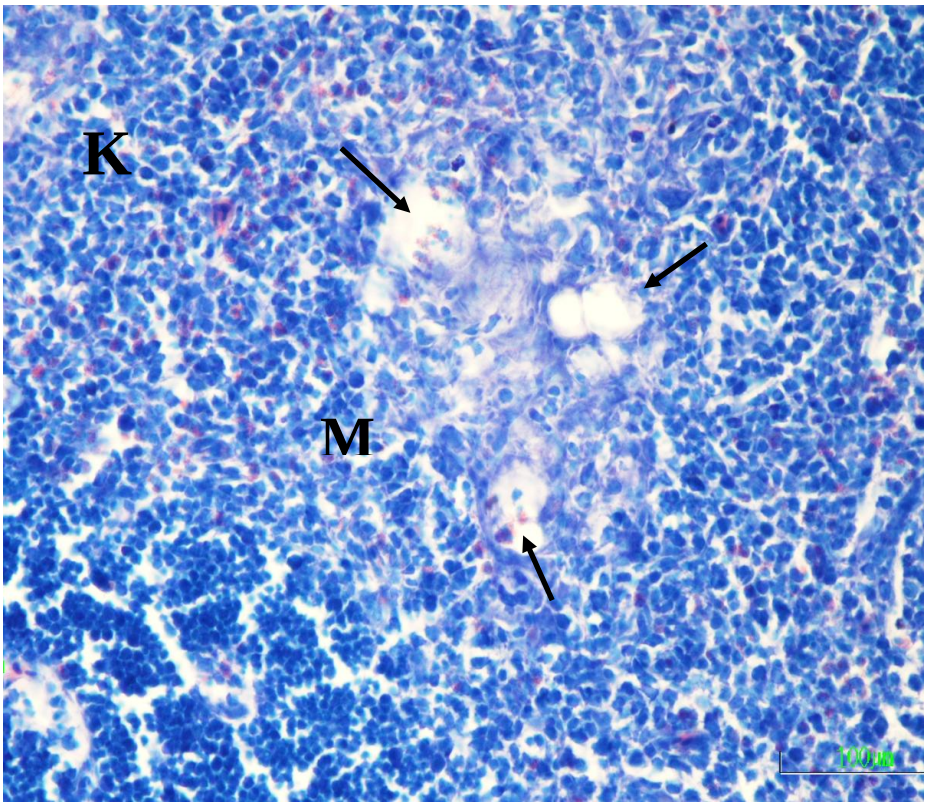
Şekil 3.8. Kuluçkanın on beşinci gününde, 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Oklar) ANAE-pozitif lenfositler. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

3.2.3. Kuluçkanın On Sekizinci Günü

Kuluçkanın on sekizinci gününde, kontrol gruplarında timusun kapsül ve lopçuklar arası bağ dokusunun genişlemiş olduğu dikkati çekti. Bu dönemde timusun histolojik gelişimi hemen hemen tamamlanmış durumdaydı ve lopların korteks ve medulla kısımları belirgin biçimde ayrılabilmekteydi (Şekil 3.9). Lopların interlobuler bağ dokusu bölmelerinin genişlediği, medulladaki vaskülarizasyonun oldukça belirgin bir şekilde artmış olduğu dikkati çekti. Bazı kesitlerde kistik yapıların irileşerek daha da belirginleştikleri dikkati çekti.



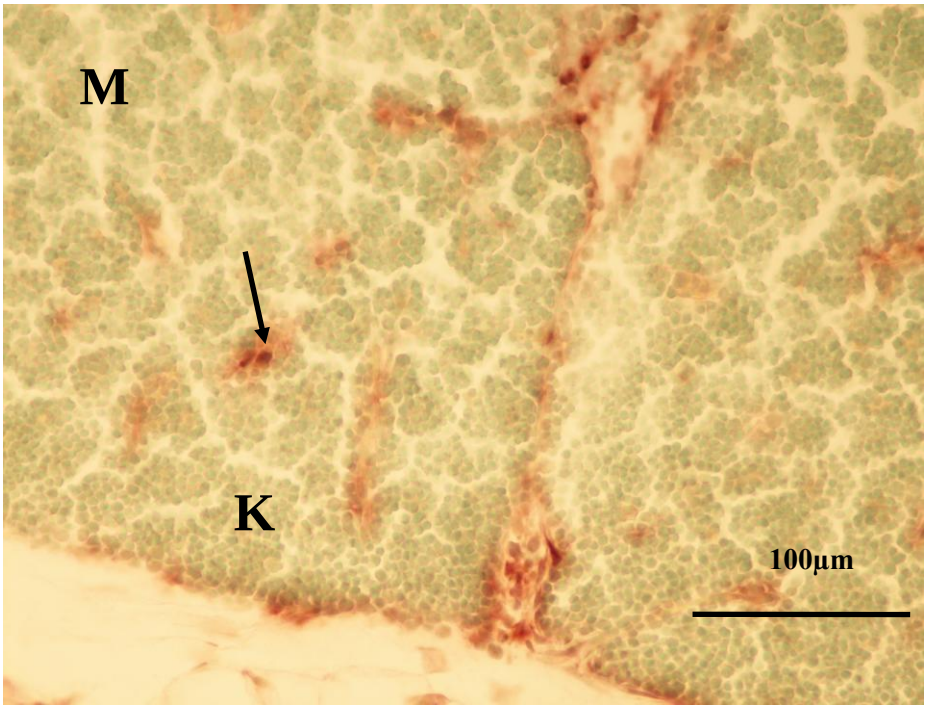
Şekil 3.9. Kuluçkanın on sekizinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Ok) İnterlobular mezenşim. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.10. Kuluçkanın on sekizinci gününde, 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Oklar) Medullar kistler. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.

Deney gruplarından özellikle 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplardaki embriyoların timus medullaları, hücre bakımından nispeten fakirdi. Bu gruplarda erken involütif değişiklikler daha belirgin ve kistik yapılar daha fazla sayıdaydı (Şekil 3.10).

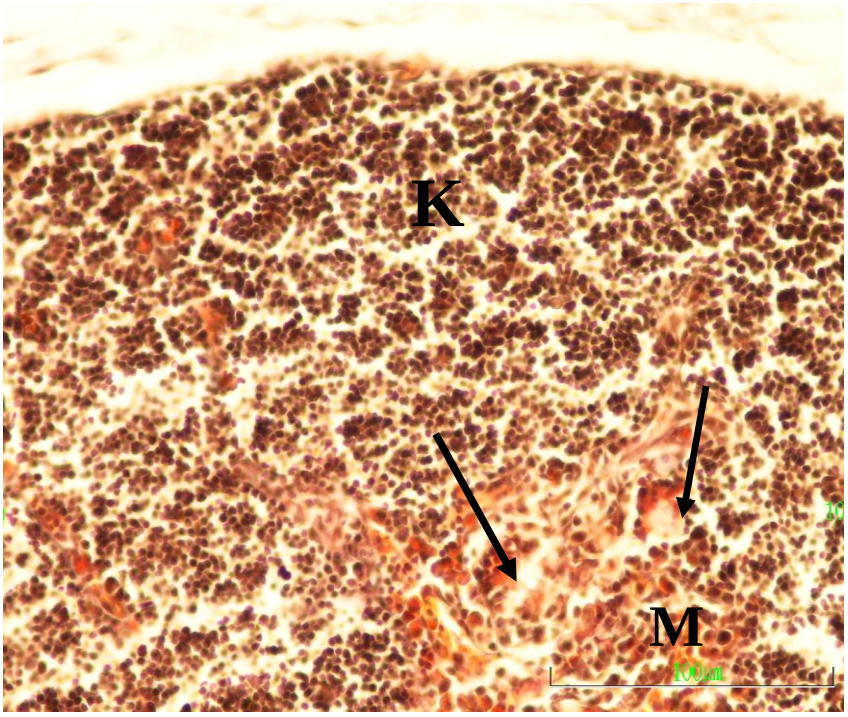
Bu dönemde, kontrol gruplarının timus kesitlerinde ANAE pozitif lenfositlere önceki dönemdekinden daha sıklıkla rastlandı (Şekil 3.11). ANAE pozitif lenfosit yoğunlukları bakımından kontrol ve deney grupları arasında dikkat çekici fark tespit edilmedi.



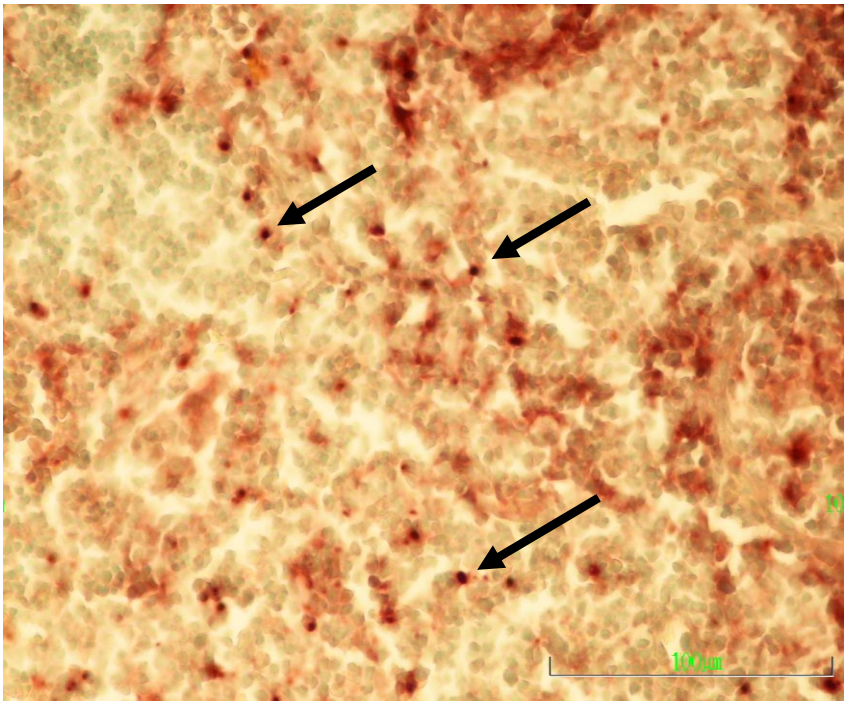
Şekil 3.11. Kuluçkanın on sekizinci gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Ok) ANAE-pozitif lenfosit. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

3.2.4. Kuluçkadan Çıkış Günü

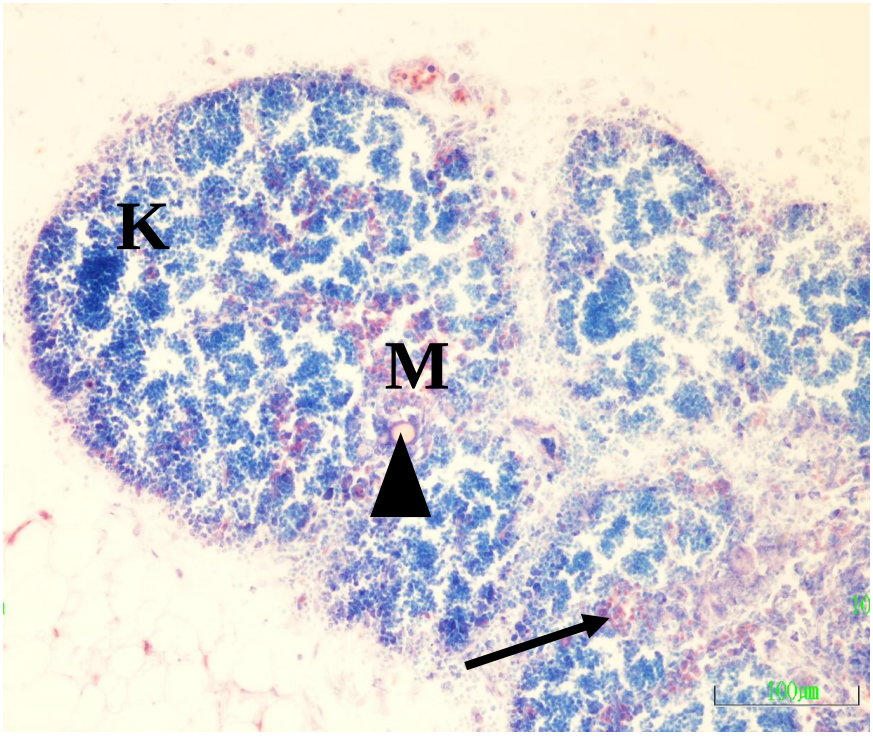
Kuluçkadan çıkışın ilk gününde histolojik gelişimi tamamlanmış olan civciv timus loplarının medulla bölgesindeki kistik yapılar, kuluçkanın on sekizinci günüyle karşılaştırıldığında biraz daha genişlemişti (Şekil 3.12). Apoptotik cisimcikleri fagosite etmiş olan makrofajlara (Tingible Body Macrophages. TBM) bu dönemde lopçukların özellikle korteksinde sıklıkla rastlandı. Bu hücrelerin sitoplâzmalarında çok sayıda fagosite edilmiş apoptotik cisimciklerin bulunduğu dikkati çekti.



Şekil 3.12. Kuluçkadan çıkış gününde, Kontrol 1 grubundan bir civcivin timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Oklar) Medullar kistler. Üçlü Boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.13. Kuluçkadan çıkış gününde, Kontrol 1 grubundan bir civcivin timus kesiti görülmekte. Oklar) ANAE-pozitif lenfositler. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.14. Kuluçkadan çıkış gününde, deney gruplarından 500 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir civcivin timus kesiti görülmekte. K) Korteks, M) Medulla, Ok) Hassal cisimciği, Ok başı) Medullar kist. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.

Bu dönemde, timus kesitlerinde ANAE pozitif lenfositlere önceki dönemdekinden daha sıklıkla rastlandı (Şekil 3.13). Kontrol grubuyla deney gruplarının ANAE pozitif lenfosit yoğunlukları arasında belirgin fark tespit edilmedi.

Deney gruplarından 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruplarda, timus lop ve lopçuklarının küçüldükleri, loplardaki hücre yoğunluğunun azaldığı ve psödoeozinofil morfolojisi gösteren hücrelerin daha fazla sayıda bulundukları dikkati çekti. Bu gruplarda, lopçukların medulla bölgelerindeki Hassal cisimciklerinin sayısının artış gösterdiği gözlendi (Şekil 3.14).

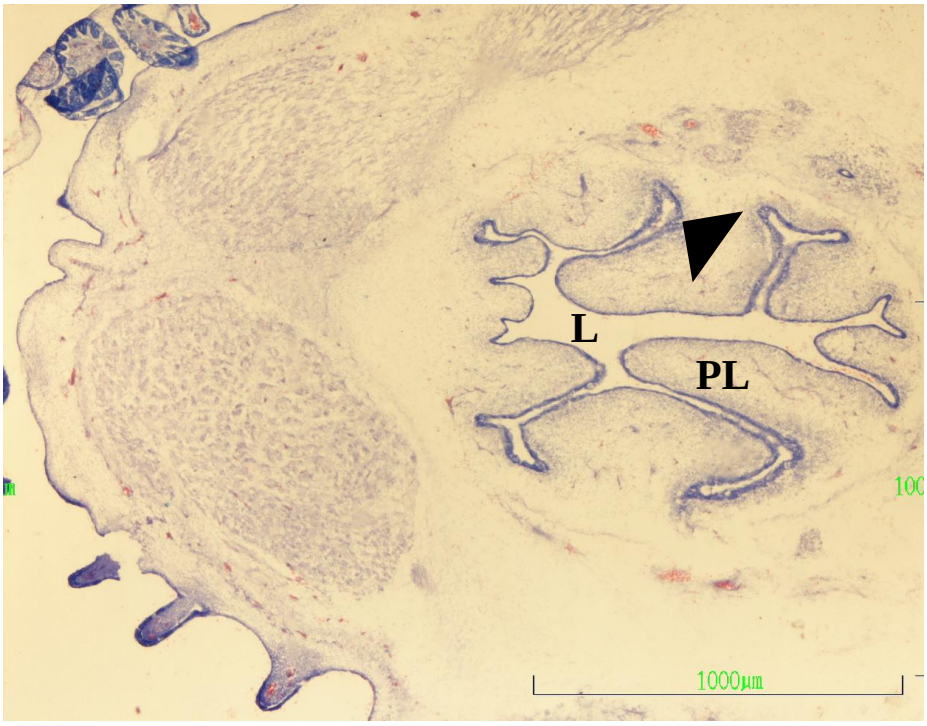
3.3. Kontrol ve Deney Gruplarında Bursa Fabricii'nin Embriyonik Gelişimi

3.3.1. Kuluçkanın On Birinci Günü

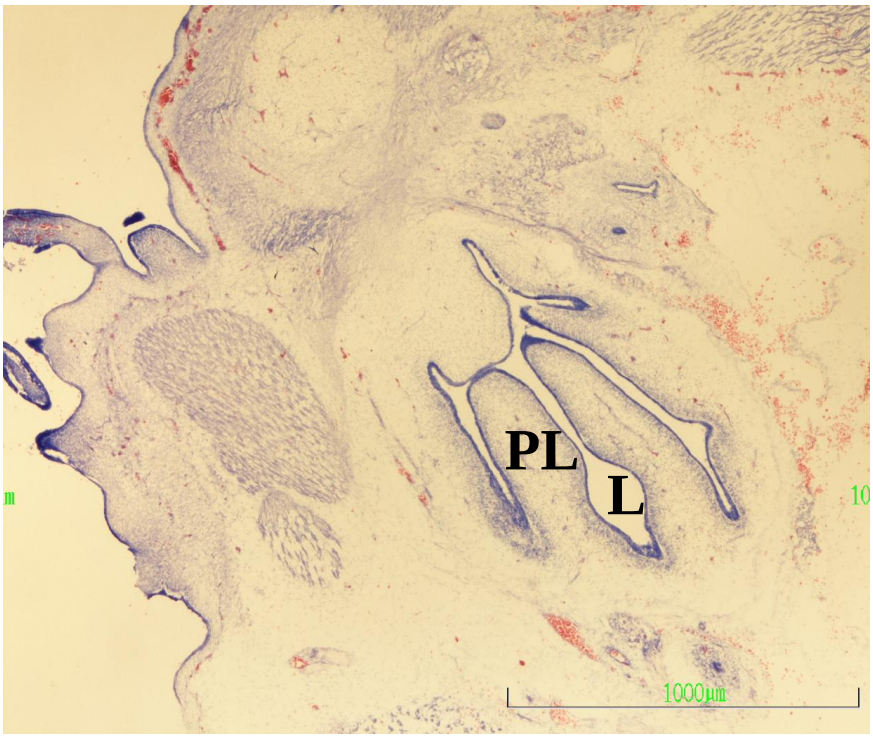
Bu dönemde kontrol gruplarının bursa Fabricii kesitlerinde, organ taslağının lümeni oldukça geniş olup, plikalar şekillenme aşamasındaydı. Bu dönemde; iri, bazofilik sitoplâzmalı hücrelere, epitel katın altında yerleşen az sayıda hücreden

oluşan gruplar halinde rastlandı. Mezenkimde yer yer hematopoietik odaklar da gözlendi (Şekil 3.15).

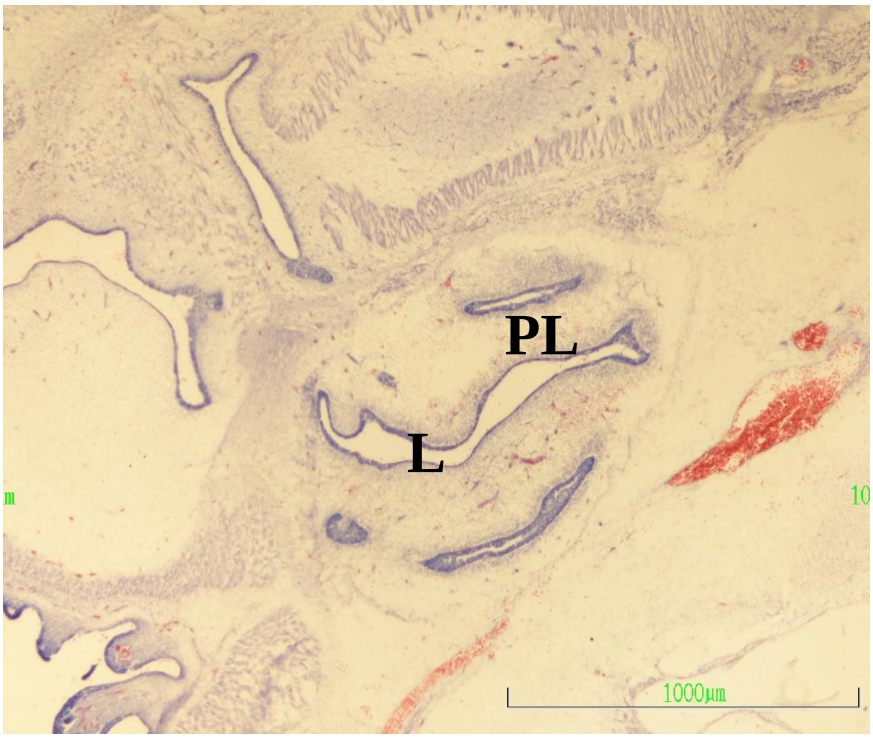
Deney gruplarından 100 ng, 500 ng ve 1,000 ng Sunset Yellow FCF (E110) verilen grupların bursa Fabricii taslaklarında ise henüz epitel tomurcuğu şekillenmesinin başlamamış olduğu dikkati çekti. Deney gruplarından özellikle 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) verilen grubun bursa Fabricii taslağında plikaların kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında daha az gelişmiş olduğu tespit edildi (Şekil 3.16). Deney gruplarından özellikle 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) verilen grubun bursa Fabricii taslaklarında epitelyum tomurcukları ve plikaların henüz oluşmadığı ve geniş merkezi bir lümenin olmadığı dikkati çekti (Şekil 3.17).



Şekil 3.15. Kuluçkanın on birinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii taslağını da içine alan kesit görülmekte. L) Lümen, PL) Plika, Ok başı) Gelişmekte olan epitel tomurcuğu, Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



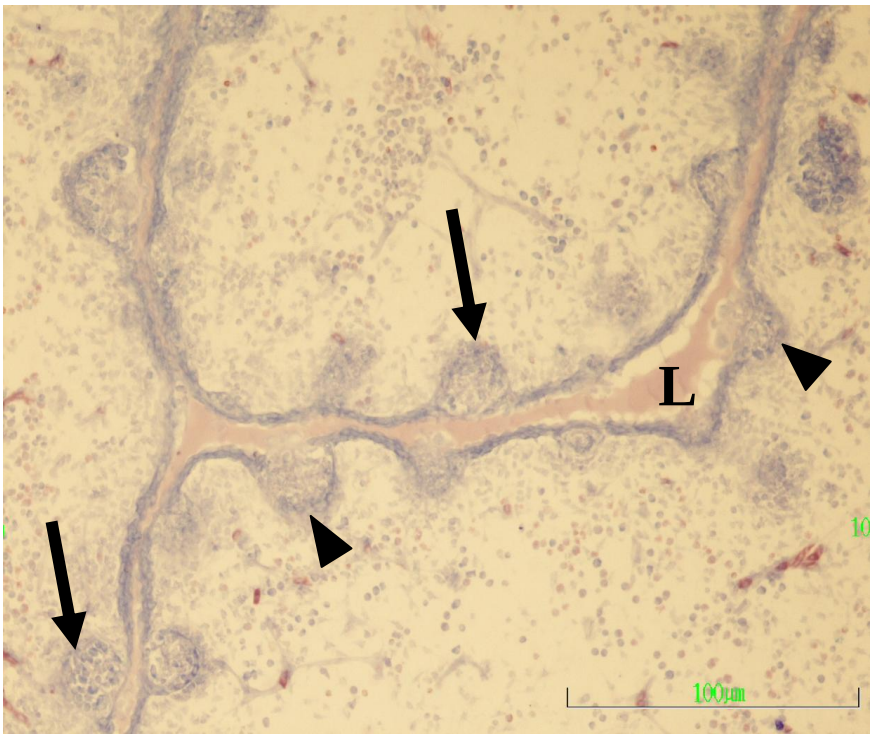
Şekil 3.16. Kuluçkanın on birinci gününde, 500 ng/yumurta verilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii taslağını da içine alan kesit görülmekte. L) Lümen, PL) Plika, Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



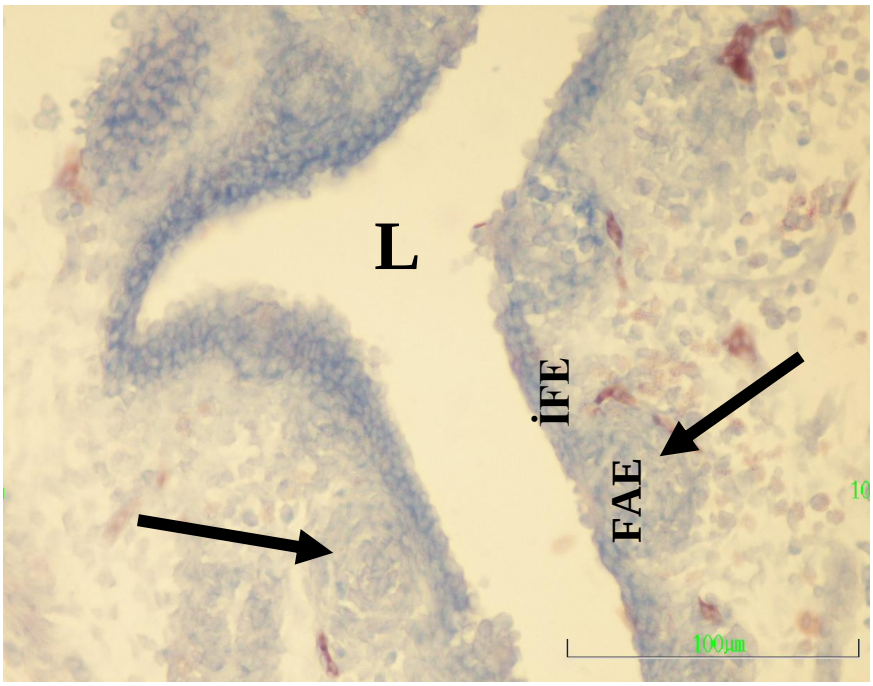
Şekil 3.17. Kuluçkanın on birinci gününde, 1,000 ng/yumurta verilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii taslağını da içine alan kesit görülmekte. L) Lümen, PL) Plika, Pappenheim'ın panoptik boyasaı. Büyütme çizgisi: 100µm.

3.3.2. Kuluçkanın On Beşinci Günü

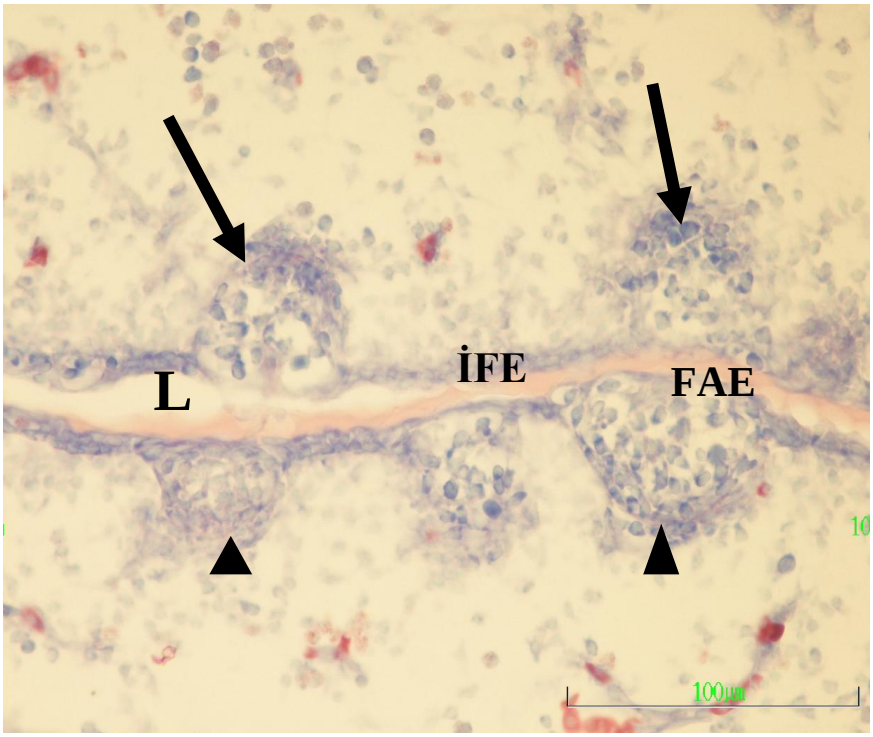
On beşinci günde tomurcuk şekillenmesinin oldukça ilerlemiş olduğu; tomurcukların birçoğunun gelişmelerini büyük ölçüde tamamladığı ve organa özgü lenf foliküllerinin medulla kısımlarının histolojik yapısını kazanmış oldukları gözlendi (Şekil 3.18).



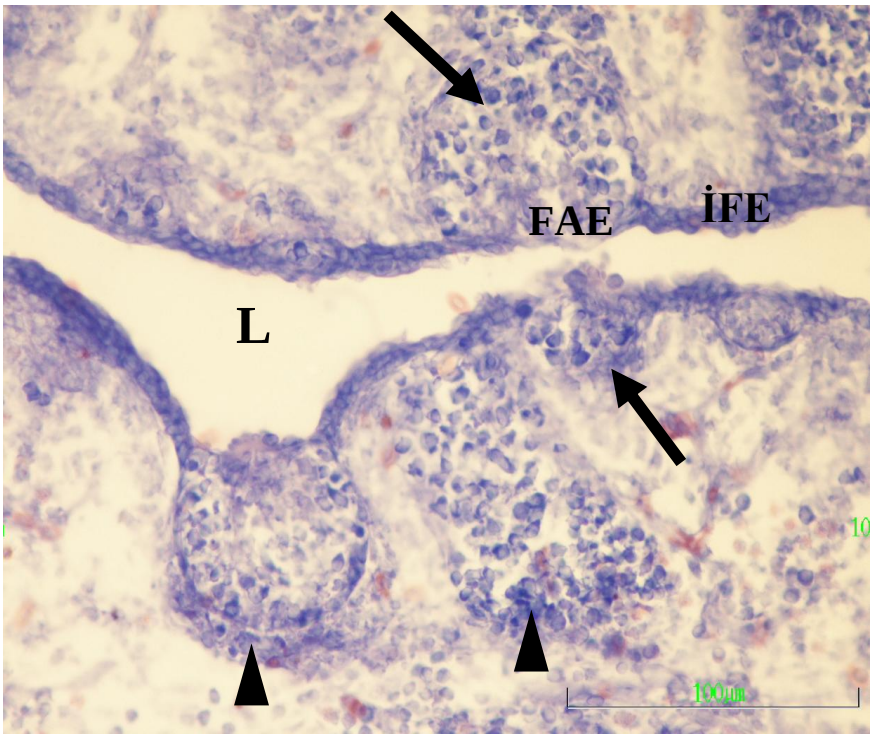
Şekil 3.18. Kuluçkanın on beşinci gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, Ok başları) Subnodüler epitelyum, Oklar) Gelişmekte olan lenf folikülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



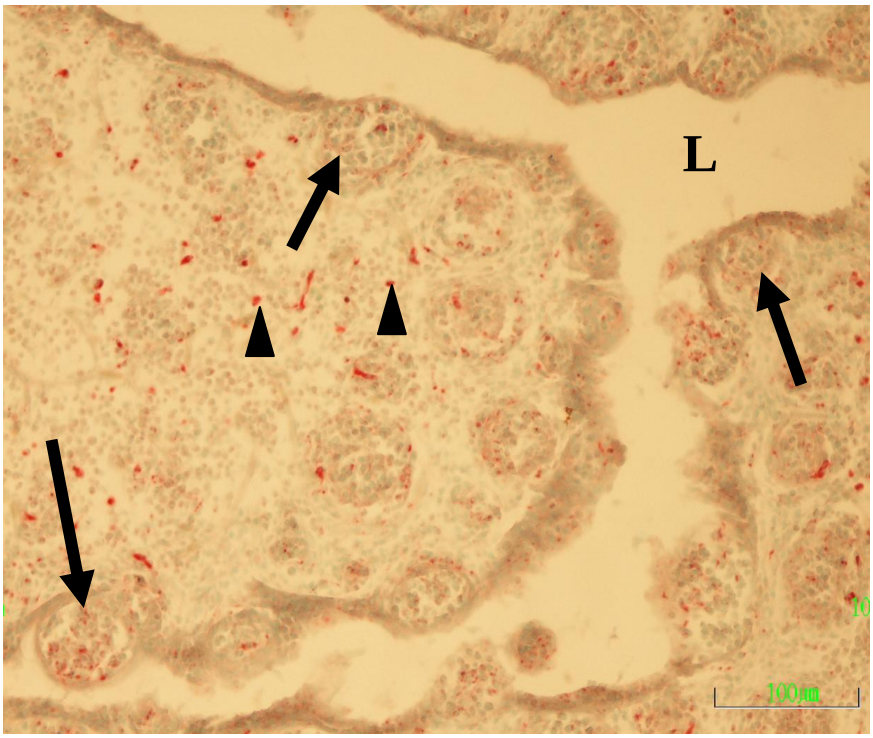
Şekil 3.19. Kuluçkanın on beşinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, FAE) Folikül-ilişkili epitel, İFE) İnterfoliküler epitel, Oklar) Gelişmekte olan lenf folikülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.20. Kuluçkanın on beşinci gününde, 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, FAE) Folikül-ilişkili epitel, İFE) İnterfoliküler epitel, Ok başları) Subnodüler epitelyum, Oklar) Gelişmekte olan lenf folikülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.21. Kuluçkanın on beşinci gününde, 500 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, FAE) Folikül-ilişkili epitel, İFE) İnterfoliküler epitel, Ok başları) Subnodüler epitelyum, Oklar) Gelişmekte olan lenf folikülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.22. Kuluçkanın on beşinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, Oklar) Gelişmekte olan lenf folikülleri, Ok başları) ACPaz-pozitif lenfoid hücreler. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

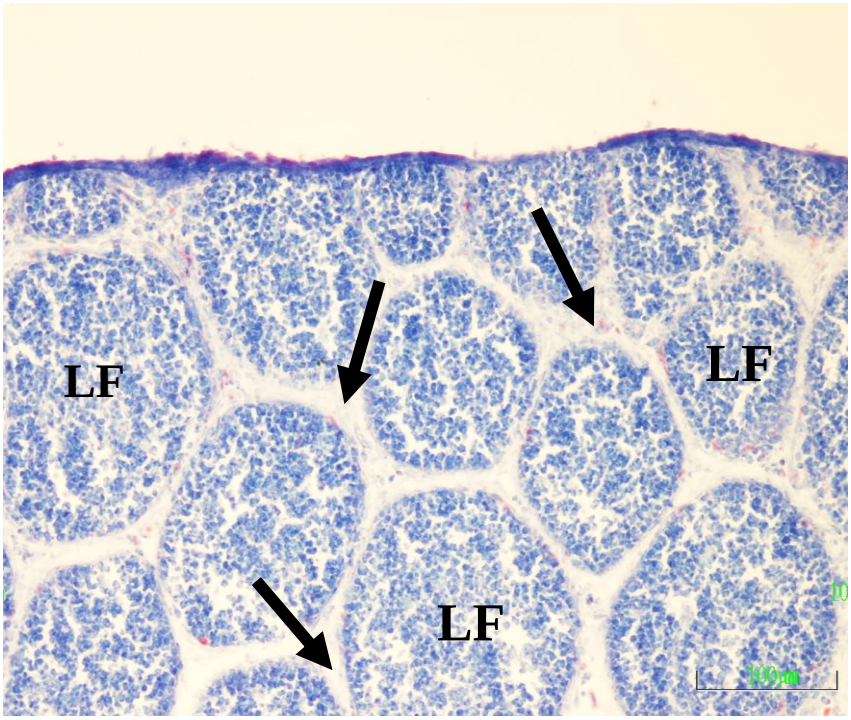
Subnodüler epitelyum hücrelerinin, bu yapıları yanlardan ve bazal yüzden tamamen çevreleyen bir katman oluşturduğu ve mezenkime doğru invagine olan tomurcukların subnodüler epitelyum katmanı ile mezenkim arasında çoğunlukla dar bir aralığın bulunduğu dikkati çekti. Organ bu dönemde, dıştan fibromüsküler bir katmanla çevrelenmiş durumdaydı. Tomurcukların lümene bakan yüzlerini örten epitelyum hücrelerinin, foliküller arası bölgeyi örten epitel (interfoliküler epitel, İFE) hücrelerinden farklı histolojik görünüme sahip oldukları, yassılıp-uzamaları nedeniyle dejenere oldukları dikkati çekti. Bu hücrelerin hemen altında epiteloid karakter kazanmış olan bazofilik bir hücre sırasının bulunduğu gözlendi. Foliküllerin medullalarındaki lenfosit sayıları artmış durumdaydı (Şekil 3.19).

Bu dönemde, 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney gruplarından elde edilen embriyoların bursa Fabricii'lerindeki lenf foliküllerin gelişiminin belirgin biçimde baskılanmış olduğu ve hücreden fakir oldukları dikkati çekti (Şekil 3.20). Bu gruplarda, kontrol grubuna göre plikaların küt ve kısa oldukları, FAE'nin ise çökmüş olduğu tespit edildi (Şekil 3.21).

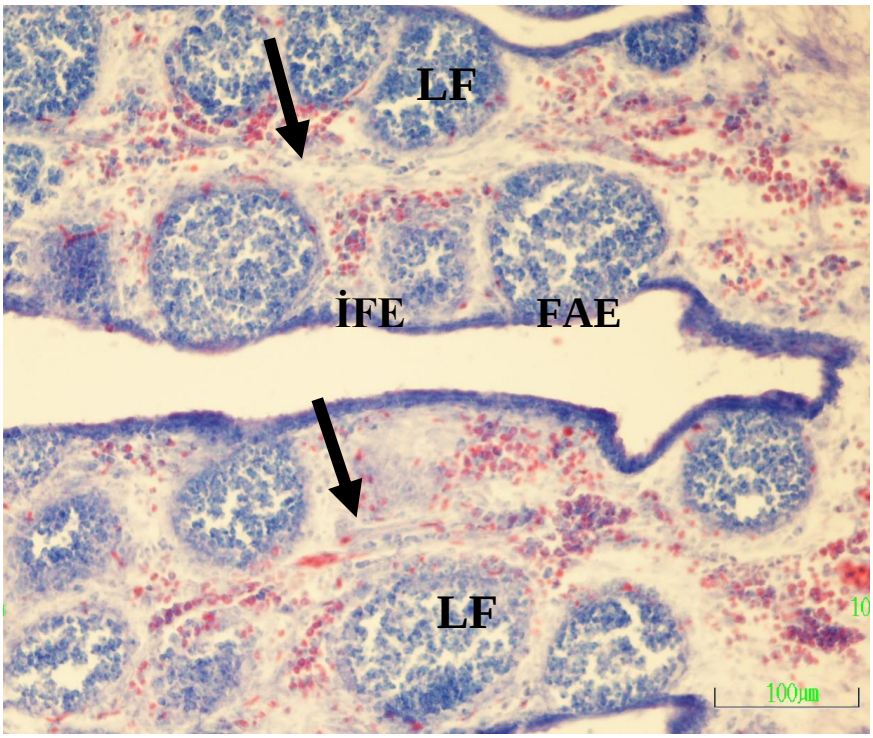
Bu dönemde bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin merkezi bölgelerinde ve organ taslağının bağ dokusundaki eritropoietik ve granülopoietik odaklarda, kontrol gruplarında nispeten daha fazla sayıda olmak üzere ACP-az pozitif lenfositlere rastlandı (Şekil 3.22).

3.3.3. Kuluçkanın On Sekizinci Günü

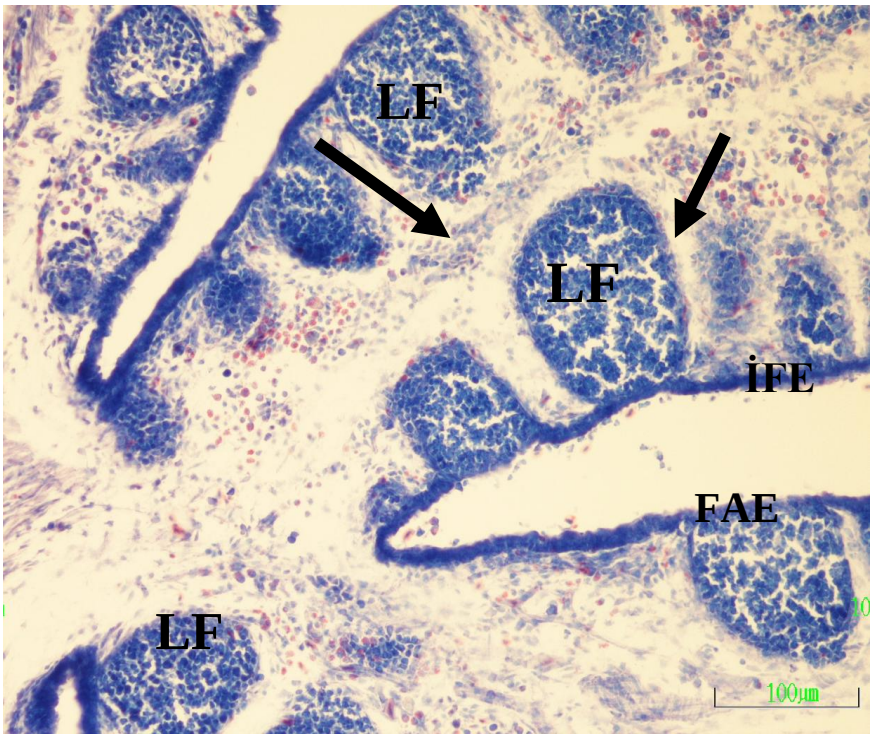
Organın lamina propriyası, korteks ve medulla kısımlarının gelişmeleri hemen hemen tamamlanmış olan ve lenfo epitelyal bir lenfoid organ olan bursa Fabriciiye özgü histolojik yapıya sahip lenf folikülleriyle tamamen doldurulmuştu (Şekil 23). Foliküllerdeki bu gelişmeye paralel olarak gerileyen interfoliküler bağ dokusu dar bölmeler halindeydi. Bu bölgedeki eritropoietik ve granülopoetik odaklar küçülmüş durumdaydı. Lenf folikülerinin medullalarında oldukça yoğun bir lenfopoiezis gözlendi. Lenfositlere, foliküllerin kortekslerinin dışındaki interfoliküler bağ dokusunda da rastlandı. Bu dönemde, kortiko-medullar sınır hücreleri dışında dar bir lenfosit katmanı halindeki folikül korteksinin gelişmesi henüz tamamlanmamıştı. FAE, IFE'den belirgin bir şekilde ayrılmaktaydı (Şekil 3.23).



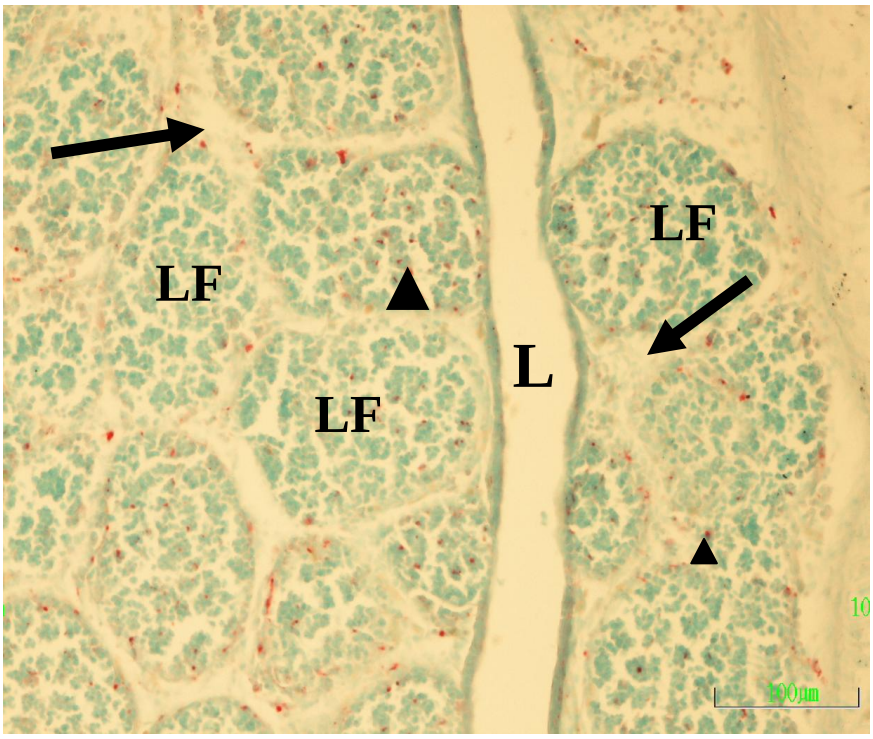
Şekil 3.23. Kuluçkanın on sekizinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. LF) Lenf folikülleri, Oklar) İnterfoliküler bağ dokusu trabekülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.24. Kuluçkanın on sekizinci gününde, 100ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. LF) Lenf folikülleri, FAE) Folikül-ilişkili epitelyum, İFE) İnterfoliküler epitelyum, Oklar) İnterfoliküler bağ dokusu trabekülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.25. Kuluçkanın on sekizinci gününde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. LF) Lenf folikülleri, FAE) Folikül-ilişkili epitelyum, İFE) İnterfoliküler epitelyum, Oklar) İnterfoliküler bağ dokusu trabekülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.

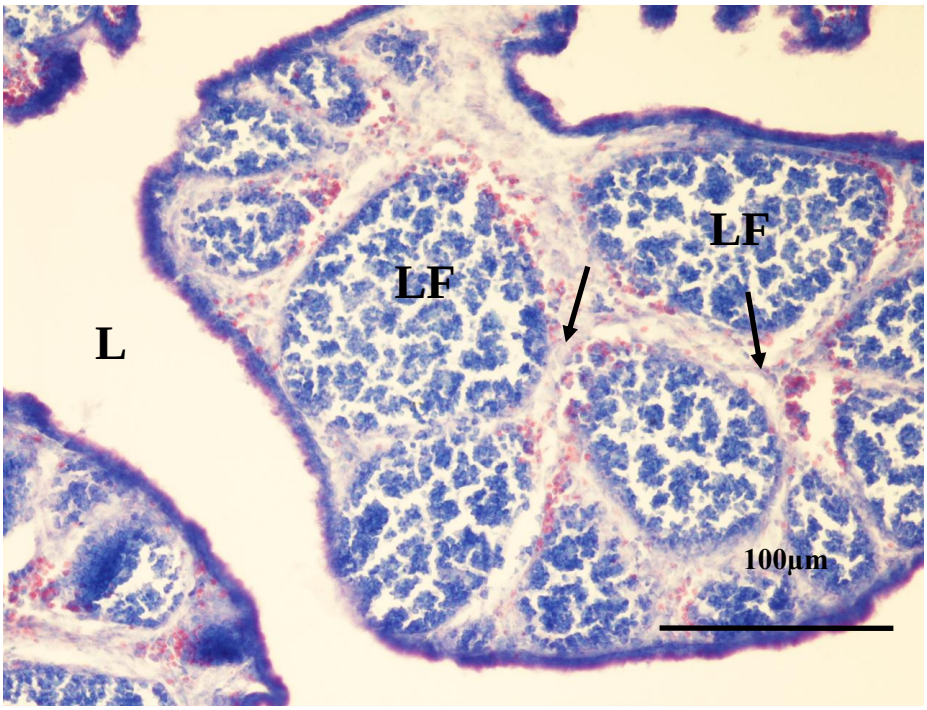


Şekil 3.26. Kuluçkanın on sekizinci gününde, Kontrol 1 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, LF) Lenf folikülleri, Ok başları) ACPaz-pozitif lenfositler, Oklar) İnterfoliküler bağ dokusu trabekülleri. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

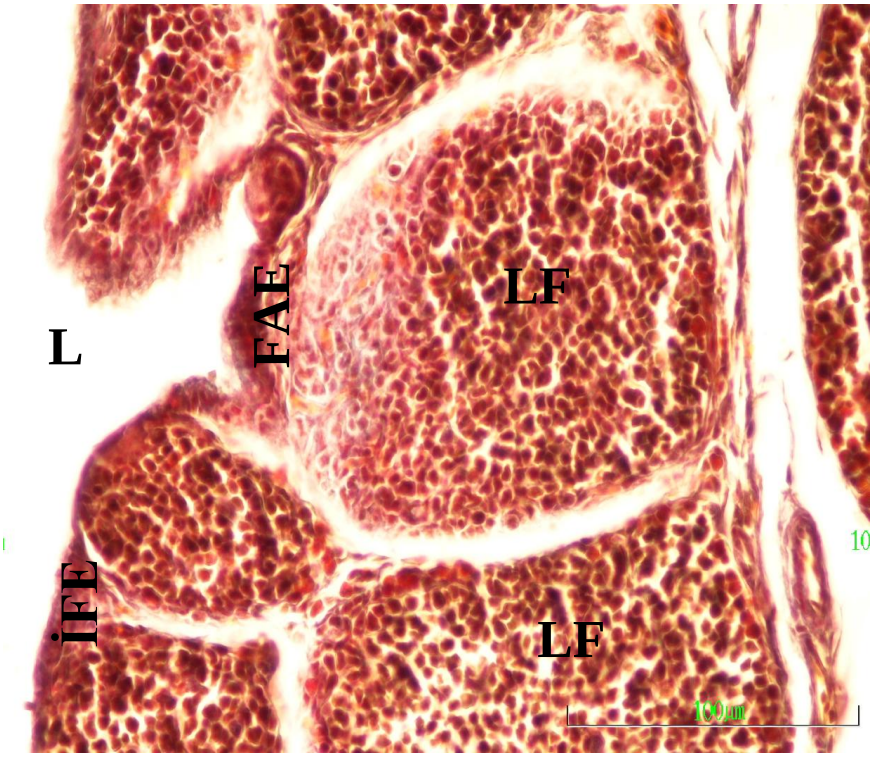
Bu dönemde, 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen deney gruplarının bursa Fabricii'lerindeki lenf folikülü gelişmesinin baskılanmış olduğu ve foliküllerde kontrol grubuna göre daha yoğun heterofil infiltasyonu olduğu gözlendi (Şekil 3.24). Deney gruplarından özellikle 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grubun bursa Fabricii'sinde FAE gelişiminin baskılanmış olduğu dikkati çekti (Şekil 3.25). ACPaz pozitif hücreler kontrol gruplarında daha fazlaydı (Şekil 3.26).

3.3.4. Kuluçkadan Çıkış Günü

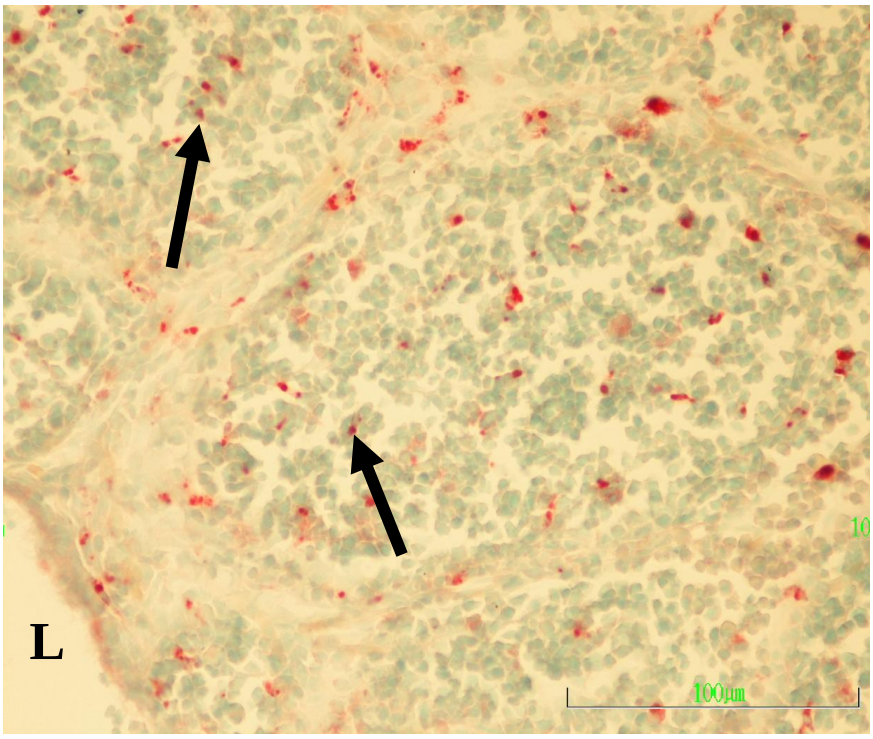
Bu dönemdeki bursa Fabricii'nin histolojik yapısı, kuluçkanın on sekizinci günündeki histolojik yapıya oldukça benzemekteydi. Bu dönemde de, organa özgü lenf folikülleri organın lamina propriyasını tamamen doldurmuş durumdaydı (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Kuluçkadan çıkış gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, LF) Lenf folikülleri, Oklar) İnterfoliküler bağ dokusu trabekülleri. Pappenheim'ın panoptik boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.28. Kuluçkadan çıkış gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, LF) Lenf folikülleri, FAE) Folikül-ilişkili epitelyum, İFE) İnterfoliküler epitelyum, Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.29. Kuluçkadan çıkış gününde, Kontrol 2 grubundan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, Oklar) ACPaz-pozitif lenfositler. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.30. Kuluçkadan çıkış gününde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptan bir embriyonun bursa Fabricii kesiti görülmekte. L) Lümen, Oklar) ACPaz pozitif lenfositler. ACPaz demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100µm.

Foliküllerin kortiko-medullar sınır hücrelerinin dışında şekillenmekte olan korteks bölgesinin, önceki dönemdekinden biraz daha genişlemiş olduğu, İFE ve FAE'nin gelişiminin tamamlanmış olduğu tespit edildi (Şekil 3.28). İnterfoliküler bağ dokusunda, granülopoietik odaklara bu dönemde de rastlandı.

Deney gruplarından 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupların bursa Fabricii'lerindeki lenf foliküllerinin, kontrol gruplarındakinden daha küçük olmalarının yanı sıra, foliküllerdeki lenfosit yoğunluğunun daha düşük olduğu dikkati çekti.

ACP-az pozitif lenfositlere foliküllerin medullalarında sıklıkla rastlandı. Aynı zamanda İFE'nin epitel hücrelerinin apikal sitoplâzmaları ile retikulum hücreleri ve makrofajların da ACP-az pozitif reaksiyon verdikleri gözlendi (Şekil 3.29). Deney gruplarından 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen grupların bursa Fabricii'lerindeki lenfosit yoğunluğu düşük olduğundan, bu gruplarda ACP-az pozitif lenfositlere de seyrek olarak rastlandı (Şekil 3.30).

4. TARTIŞMA

Modern yaşam stilinde, yarı mamul ve hazır gıdaların tüketimi günlük beslenmede önemli bir yer tuttuğu ve bunların hazırlanmasında bol miktarda gıda katkı maddesi kullanıldığından, bu maddelere ve özellikle de gıda boyalarına maruziyet kaçınılmaz bir hale gelmiştir.

Gıda boyaları üzerinde daha önce yapılmış olan araştırmalar genellikle saha tarama çalışmaları, klinik, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalardır (Radomski ve Mellinger 1962, Gaunt ve ark 1974, Price ve ark 1978, Poul ve ark 2009, Ghoreishi ve ark 2012). Avrupa Ülkeleri'nde çocukların (1-10 yaşlar) gıdayla aldıkları Sunset Yellow FCF (E110) seviyesi 0.3-6.7 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmıştır. İngiliz erişkinleri için alkolsüz içeceklerle alınan değer 0.5-1.1 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak bildirilmiştir. Bulunan değerler, genel olarak geçici kabul edilebilir günlük alım seviyesi (ADI) olan 1 mg/kg/vücut ağırlığı/gün seviyesinden daha düşüktür. Bununla birlikte, yüksek seviyelere maruz kalan çocukların değerleri (0.2-5.8 mg/kg vücut ağırlığı/gün) ADI seviyesinin üzerinde veya onun üst sınırındadır. Sunset Yellow FCF (E110) için üst seviye sınırlarının belirlenmesinde, boyada kanun dışı olarak bulunan ve istenmeyen Orange II ve Sudan I gibi sülfonatlı boyalarla, temel renksiz maddeler olan sodyum klorür ve sodyum sülfat düzeylerinin de dikkate alınması gereklidir (EFSA Journal 2009). Çünkü gıda boyalarının içerdikleri yan ürünler asıl maddenin etkisini değiştirebilir veya başka yan etkilere yol açabilir. Günlük kullanım dozu JECFA tarafından 1982'de ve SCF tarafından 1984'te ortalama günlük tüketim miktarı (Average Daily Intake, ADI) 0-2.5 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlenen (EC 2008/128/EC ve JECFA 2006) Sunset Yellow FCF'nin (E110), gıda maddelerinde kullanılan ürünün sodyum tuzu olarak boya saflık düzeyi %85'ten az olup, kalan %15'i sodyum klorür veya sodyum sülfattan oluşmaktadır. Boya içinde < %5'ten az miktarda diğer boyar maddelerle <%0,5'ten az miktarda 4-aminonaftalen-1-sülfonik asit, 7-hidroksinaftalen-1, 3-disülfonik asit, 3- hidroksinaftalen2, 7-disülfonik asit, 6-hidroksinaftalen2-sülfonik asit, 4.4'-diazoaminodibenzen sülfonik asit ve 6.6'-oksidinaftalen-1.3-disülfonik asit bulunur. Piyasadaki üründe Orange II miktarı, üreticisine göre değişmekle birlikte, %1 civarındadır. FAO/WHO yönetmeliklerine göre bu boyanın müsaade edilen üst limiti %2 iken, ABD'de bu seviye %1'dir. Genotoksik ve karsinojenik olan Sudan

I'in (1-(fenilazo)-2-naftalenol) üst limiti ise 1 mg/kg olarak belirlenmiştir (JECFA 2009).

İrlanda'da, içereceklerde yapılan taramalarda 61 üründe Sunset Yellow FCF (E110) düzeyi 0.1 mg/L olan belirlenebilir seviyenin (Limit of Detection-LOD) üzerinde bulunmuştur. Üç üründe ise seviye müsaade edilen maksimum seviyenin üstündedir. Seviyeler genel olarak 1-61 mg/L arasındadır. Bir başka taramada ise (FSAI 2005), 54 alkolsüz içeceğin %20'sinde Sunset Yellow FCF (E110) seviyesi, hesaplanan değer (Level of Quantification - LOQ) olan 1.0 mg/L'den (1-49 mg/L arasında) yüksektir (EFSA Journal 2009).

Avrupa Birliği İçecek Derneği'nin (UNESDA) Sunset Yellow FCF (E110) için en yüksek kullanım seviyesi 2005 yılında 50 mg/L olarak belirlenmiştir (Tennant 2006). Aynı derneğin 2009 yılı raporunda ise, seviye 1-48 mg/L olarak değiştirilmiştir (UNESDA 2009). Avrupa Gıda ve İçecek Endüstrileri Konfederasyonu Mevcut kullanım seviyesini 1-48 mg/L olarak korumuştur (CIAA 2009). Fransız şirketleri bu düzeylerin 0.6-46 mg/L arasında olduğunu bildirmişlerdir. İngiltere için Sunset Yellow FCF (E110)'nun müsaade edilen düşük ve maksimum düzeyleri 4- 50 mg/L arasındadır (ELC 2009). Düşük oranlı alkollü içeceklerde (%15'ten düşük alkol seviyeli) yapılan tarama sonuçları, Sunset Yellow FCF (E110) seviyesinin ortalama 17 mg/L olduğunu göstermektedir (FSAI 2009). Avrupa Alkollü İçecekler Organizasyonu (CEPS), kullanım seviyesinin 0-100 mg/L arasında olduğunu bildirmiştir (CEPS 2009).

Avrupa ülkelerinde farklı gıda maddelerindeki Sunset Yellow FCF (E110) kullanım düzeyi, 66 ürün üzerinde yapılan ölçümlere göre 1-106 mg/kg arasındadır (FSA 2002). Farklı kuruluşların belirttikleri değerler 7-50 mg/kg arasında değişmekteyse de meyve suları ve diğer gıda maddelerindeki tipik kullanım seviyeleri 0.1-200 mg/kg/vücut ağırlığı arasında değişmektedir. Maksimum değer, baharatlar, turşu, çeşniler, Hint turşusu gibi bazı ürünlerde 450 mg/kg'a kadar çıkabilmektedir (CIAA 2009).

Günlük olarak gıdalarla alınan Sunset Yellow FCF (E110) miktarının belirlenmesine yönelik teorik hesaplamalar, Avrupa ülkelerinde yaşayan 60 kg vücut ağırlığındaki ve günde 1.5 litre Sunset Yellow FCF (E110) içeren içecek (müsaade

edilen üst limit 200 mg/L Sunset Yellow FCF) ve 375 g katı gıda (müsaade edilen üst limit 500 mg/kg Sunset Yellow FCF) tüketen birinin alacağı miktarın 8.1 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu ortaya koymaktadır (EC 1998). Çocuklar için de bu değer bulunmuş olmakla birlikte, çocukların vücut ağırlığı düşük olduğundan (3 yaş için 15 kg vücut ağırlığı) kg vücut ağırlığı başına alınan miktar yüksek olmaktadır (EFSA 2009). Yaşları 1.5-4.5 arasında ve vücut ağırlığı 15 kg olan İngiliz okul öncesi çocuklar için en düşük ve en yüksek seviyeler, 1.4 mg/kg vücut ağırlığı/gün ve 3.5 mg/kg vücut ağırlığı/gün arasındadır. İngiliz erişkinler için 0.5 mg/kg vücut ağırlığı/gün ve 1.1 mg/kg vücut ağırlığı/gündür.

Sunset Yellow FCF'nin (E110) metabolizması üzerinde yapılan araştırmalar, sıçanlarda oral yolla alınan tek dozun %0.8'nin dışkıyla yıkılmadan atıldığını göstermektedir. Safra ve idrarla atılma oranı sırasıyla %3 ve %0.9'dur. İdrarda rastlanan metabolitleri sülfanilik asit ve 1-amino-2-naftol-6-sülfonik asittir. Dışkıdaki metabolitleri hakkında bilgi yoktur. Aromatik aminlere parçalanmanın karaciğer enzimlerinden ziyade bağırsak bakterilerine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Radomski ve Mellinger 1962). Damar içi yolla sıçanlara verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) %20-30'u 6 saat sonra safrada bulunmuştur (Ryan ve Wright 1961). Tavşanlara tek doz gıdayla verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) %2'si rengi değişmemiş boya olarak ve azo indirgeme ürünü olan sülfanilik asit (%54) ile 1-amino-2-naftol-6-sulfonik asit (%55) halinde 24 saat içinde idrarla atılmıştır (Daniel 1962). Sunset Yellow FCF'nin (E110) Faz I ve Faz II ilaç metabolize eden enzimler (CYP2A6, UGT1A6 ve UGT2B7) üzerinde ne bir substrat, ne de inhibitör olarak önemli etkisi bulunmamıştır (Kuno ve Mizutani 2005). Sunset Yellow FCF'nin (E110) fare ve sıçanlarda oral yolla verildiğinde LD50 dozları sırasıyla > 6,000 ve >10, 000 mg/kg vücut ağırlığıdır. Gıdayla alınan 2000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda ölüm tespit etmeyen ve (Sasaki ark 2002), Sunset Yellow FCF'nin (E110) LD_{50} dozunun bu seviyenin üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Uzun süreli yedirme denemelerinde, 250 g vücut ağırlığına sahip sıçanlara içme suyuyla %2 solüsyon halinde günde 25 ml solüsyon alacakları şekilde (2 g/kg vücut ağırlığı/gün dozunda) 10 ay süreyle verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) karaciğerde yapısal değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir (Manchon ve Lowy 1964). Başka bir çalışmada (Gaunt ve ark 1967) ise, 0, 250, 500, 1000 ve 1500 mg/kg vücut

ağırlığı/gün dozundaki boya sıçanlara 90 gün gıdayla verilmiş hematolojik ve parametrelerle karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında değişiklik gözlenmemiştir. Hayvanların gelişme ve gıda tüketimi normal olup, yüksek dozlarda hayvanlarda hafif ishal gelişmiştir. Otopside sekumun %2-3 kadar, testislerin ise %3 kadar büyüdüğü dikkati çekmiştir.

Yapılan değerlendirmeler, batı toplumlarında gıda boyalarına karşı immün (ani ve gecikmiş tip hiper sensitivite tarzında) ve non-immün (intolerans) reaksiyonların nadir görüldüğü ve bunların görülme oranının yaklaşık olarak % 0.14-2 arasında değiştiğini ortaya koymaktadır (Young ve ark 1987, Hannuksela ve Haahtela 1987, Fuglsang 1993 ve 1994).

Gıda boyalarının davranış üzerindeki etkileri özellikle çocuklar üzerinde çalışılmıştır. McCann ve ark (2007), gıdayla alınan 4 sentetik boyanın 2 farklı karışımına, koruyucu olarak kullanılan sodyum benzoat ilavesiyle hazırlanan karışımların, 3 yaş ve 8-9 yaş gruplarındaki çocuklarda hiperaktiviteyi artırdığını tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada (McCann ve ark 2007), tartrazin (E 102), quinoline yellow (E 104), sunset yellow FCF (E 110), ponceau 4R (E 124), allura red AC (E 129), carmoisine (E 122) ve sodyum benzoat'ın (E 211) iki farklı karışımının çocukların davranışı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gıda boyalarının insanlardaki alerjik reaksiyonların primer nedeni olabileceği gibi bu reaksiyonları şiddetlendirdiği konusundaki gözlemler şüpheleri artırmıştır. Her ne kadar Bär ve Griepentrog (1960), kobaylar da Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı alerjik veya aşırı duyarlılık (hipersensitivite) reaksiyonlarının gelişmediğini bildirilmekle birlikte; Schultz-Ehrenburg ve Gilde (1987), kronik tekrarlayıcı ürtikerli 90 hastanın %4'ünde benzoatlar, sorbik asit ve Sunset Yellow FCF (E110) gibi gıda katkılarına karşı intolerans tespit etmişlerdir. Küçük bir atopik dermatitisli hasta grubunun, aralarında Sunset Yellow FCF'nin de (E110) bulunduğu ve ağız yoluyla alınan gıda katkılarına karşı aşırı duyarlılık yanıtı verdiği tespit edilmiştir (Worm ve ark 2000). Plasebo kontrollü, çift kör bir klinik çalışmada (Supramaniam ve Warner 1986), anjiyo ödemli ve/veya kronik ürtikerli 43 çocuğun bir kısmına katkılı gıda olarak opak kapsüller içinde Sunset Yellow FCF (E110) verilmiştir. Katkılı kapsül verilen 36 çocuktan 10'unda 0.1 mg dozunda Sunset Yellow FCF'ye (E110) hipersensitivite gelişmiştir. Daha az kontrollü ve aşırı duyarlılık teşhisinin

aileler tarafından gözlendiği bir başka çalışmadaysa (Wilson ve Scott 1989), 13 çocuktan biri, her biri tartrazin/Sunset Yellow FCF (E110) ihtiva eden içecek kombinasyonuna 8.5 mg/250 ml dozunda tepki oluşturmuşlardır. Renklendirilmiş antihistamin preparatı alan ekzemalı 2 hastada p-fenilen-diamin ve Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı çapraz-aşırı duyarlılık tespit edilmiştir (Sornin de Leysat 2003). Sunset Yellow FCF'ye (E110) karşı gelişen damarsal ve ürtiker reaksiyonlar gibi yan etkilerin, boyanın diğer sentetik boyalarla birlikte kullanıldığında en fazla ortaya çıkması dikkat çekicidir (Lowry ve ark 1994, Mikkelsen ve ark 1978).

Gıda boyalarının, bağışıklık sistemi organlarının histolojik yapısı ve bu organların embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Bunun nedeni, söz konusu maddelerin gıdalara ilave edilen limit değerlerinin nispeten düşük olması, verilen maddelerin bağırsaklar ve karaciğerde metabolize olması, bunların memelilerdeki plasenta bariyerinden geçişi ve geçiş oranları hakkında yeterli bilgi bulunmamasıdır. Plasenta bariyerinin bulunmadığı döllü tavuk yumurtası, bağışıklık sisteminin embriyonik gelişimi üzerinde olumsuz etkisi belirlenecek olan fiziksel ve kimyasal etkenlerin denenmesi için en uygun deney materyalidir.

Sunulan bu deneysel çalışmada; kuluçka başlangıcında döllü tavuk yumurtasının hava kamarasına 100 ng/yumurta, 500 ng/yumurta ve 1,000 ng/yumurta dozlarında enjekte edilen Sunset Yellow FCF'nin (E110), kanatlı timusu ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde her iki organın embriyonik gelişimi deney ve kontrol gruplarında belirlenerek, gruplar arasındaki morfolojik farklar ortaya konmuş ve aynı zamanda kanatlı T lenfositlerine özgü ANAE enzimiyle, B lenfositlerine özgü ACP-az enzimleri demonstre edilerek, bu enzime sahip lenfositlerin timus ve bursa Fabricii'deki lokalizasyonları belirlenmiştir.

Plasenta bariyerinin bulunmadığı ve embriyonik gelişim aşamaları çok detaylı bir şekilde belirlenmiş olduğundan, fiziksel ve kimyasal ajanların embriyotoksik, genotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde döllü tavuk yumurtası sık tercih edilen materyallerden biridir. Jelinek (1977), döllü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak adlandırılan bir metot geliştirmiş ve

bu metot daha sonra yapılan bir çok embriyotoksisite ve teratojenite çalışmasında da uygulanmıştır. Döllü tavuk yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonuçları memelilere de uyarlanabilmektedir. Çünkü CHEST ile belirlenen toksik dozun sulandırma konsantrasyonunun 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen değer, gebe memelilerde annenin canlı ağırlığının kg'mı başına alınması gereken toksik doz olarak kabul edilmektedir (Jelinek 1977). Test; gerçekleştirilmesi kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta; canlı organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalarla hayvan hakları koruma düzenlemelerine de aykırı düşmemektedir (Jelinek ve ark 1985, Vesely ve Vesela 1991). Kemper ve Luepke (1986) de belirtilen nedenlerle tavuk yumurta testi (Hen's Eggs Test-HET) olarak da adlandırılan bir test geliştirmişler ve söz konusu testle elde edilen sonuçların memelilerde yapılan toksisite çalışmaları sonuçlarıyle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Pek çok maddenin toksisitesinin değerlendirilmesinde CHEST ve HET uygulanmış olmakla birlikte, döllü tavuk yumurtası kullanılarak Sunset Yellow FCF'nin (E110) toksik etkilerinin değerlendirildiği deneysel bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, dezenfekte edilen kuluçkalık tavuk yumurtalarının hava kamarasına 20 µL test solüsyonu enjekte edilmiştir. Zira Çelik ve ark (2000), hava kamarasına enjekte edilecek ideal test solüsyonu hacminin 20 µL olduğunu, 100 µL'den daha fazla hacimdeki enjeksiyonların yumurta içi basıncı artırarak embriyonik ölümlere neden olabileceğini ve bu durumun da test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini vurgulamıştır. Sunulan bu çalışmada, çözücü olarak kullanılan distile suyun ve delip-kapama işleminin etkilerinin belirlenmesi için Kontrol 1 ve Kontrol 2 grupları oluşturulmuştur.

Bir maddenin embriyotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, test edilecek maddenin faklı dozları denenmelidir. Verret ve ark (1964) her solüsyon için en az 2 farklı doz uyguladıkları halde, Brown ve ark (1986) en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmektedirler. Jelinek (1977) ise etkili dozun belirlenmesinde etkisiz en yüksek doz ile etkili en düşük doz arasındaki dozların denenmesi gerektiğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada, 100 ng, 500 ng ve 1,000 ng/yumurta olmak üzere 3 farklı Sunset Yellow FCF (E110) dozu kullanıldı.

Sunset Yellow FCF'nin (E110) ve metabolitlerinin plasenta bariyerinden geçişi hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte, bu maddenin memelilerde intrauterin gelişim üzerindeki etkisinin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada; nazo-gastrik gavajla, gebeliğin 6-15. günleri arasında 100, 300 ve 1,000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda Sunset Yellow FCF (E110) verilen hayvanların yavrularında canlı ağırlık düşüşü olduğu belirtilmekteyse de, sonuçların istatistiksel öneminin şüpheli olduğu vurgulanmıştır (IRDC 1972a). Yavrularda cinsiyet oranı sapması veya bozukluk tespit edilmemiştir. Benzer sonuçlar tavşanlarda yapılan benzer çalışmada da bildirilmiştir (IRDC 1972b).

Döllü tavuk yumurtası kullanılarak yapılan embriyotoksisite çalışmalarında sonuçların güvenilirliği açısından her doz grubu için kullanılan yumurta sayısı oldukça önemlidir. Bazı araştırıcılar (Verret ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986, Prelusky ve ark 1987) her grupta en az 20 yumurta kullanılması önerirken; Çelik ve ark (2000) her grupta 56 yumurta kullanmışlarıdır. Bu çalışmada da her grupta kullanılan yumurta sayısı 50'şer adettir. Bu çalışmada, Kontrol-1 ve Kontrol-2 gruplarıyla hava kamarasına 100 ng/yumurta ve 500 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF(E110) enjekte edilen deney gruplarındaki embriyoların Hamburger-Hamilton skalasına (1951) uygun gelişme evreleri gösterdikleri halde, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen gruptaki bazı embriyolarda embriyonik gelişme geriliği ve ektopia viscera gözlendi. Sunset Yellow FCF'nin (E110) genotoksisitesi üzerinde daha önce yapılan çalışma sonuçları, 0.5 g Sunset Yellow FCF/100 mL dozun, Escherichia coli üzerinde mutajenik etkisinin olmadığını ortaya koymuştur (Lück ve Rickerl 1960). Metabolik aktivasyona uğramış veya uğramamış formları da Salmonella typhimurium suşları üzerinde mutajenik değildir (Garner and Nutman 1977). Ames testinde, Salmonella typhimurium'da ters mutasyonlar gözlenmemiştir (Viola ve Nosotti 1978). Sunset Yellow FCF'ye (E110) maruz kalan Saccharomyces cerevisiae'de mitotik gen dönüşümü gözlenmemiştir (Sankaranarayanan ve Murthy 1979). İn vivo testlerde, sıçanlara 2000 mg/kg vücut ağırlığında tek doz ağız yoluyla verilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) kemik iliği mikronükleus testinde mutajenik etkisi bulunmamıştır (Westmoreland ve Gatehouse 1991). Farelere ağız yoluyla 0.17 veya 1.7 mg/kg vücut ağırlığı dozunda verilen Sunset Yellow FCF (E110), kromozom hasarı olan

hücrelerin sayısını artırmamıştır (Durnev ve ark 1995). Sonuçlar, Sunset Yellow FCF'nin (E110) genotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir.

Farelerde yapılan yedirme denemesinde (Gaunt ve ark 1974), 60 fareye (30'ar erkek ve dişi) gıdayla 0.2, 0.4, 0.8 veya 1.6% oranında Sunset Yellow FCF (100, 200, 400 veya 800 mg/kg vücut ağırlığı/gün) 80 hafta yedirilmiş ve hayvanlarda ölüm oranı, canlı ağırlık kazancı, organ ağırlıkları, hematolojik ve histopatolojik bulgularda değişiklik gözlenmemiştir (Gaunt ve ark 1974). Her birinden 100'er hayvan kullanılarak iki fare hattıyla yapılan bir çalışmada (FDA 1964), diyetin % 1 ve 2 düzeyinde (1429 ve 2858 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda) 2 yıl boyunca Sunset Yellow FCF (E110) verilen hayvanlarda tümör gelişimi gözlenmemiştir. Uzun süreli (gıdanın %4'ü, 2000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda 18 ay süreyle) yedirmelerde bezli mide ve ince bağırsakta pigment birikimi olabilmektedir (Willheim ve Ivy 1953). Daha yüksek ve daha düşük dozlarla (1,000 mg/kg ve 2,500 mg/kg) yapılan uzun dönem yedirme çalışmalarında (FDA 1964) da tümör gelişimi gözlenmemiştir. Sunset Yellow FCF'nin (E110) üreme organları ve sistemin fonksiyonları üzerinde zararlı etkilerine yönelik bir çalışmada (Pierce ve ark 1974), sıçan ve köpeklerde 1,000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozun üreme performansı üzerinde olumsuz etkisi tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, Eroğlu ve Kuş (2013), brilliant blue ve Sunset Yellow FCF mikronükleus sıklığını arttırırken, mitotik indeks ve replikasyon oranlarını azaltığını tespit etmiş ve kullanılan gıda boyalarının yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada yapılan incelemelerde, kontrol gruplarında bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi Kocaöz ve ark'nın (1997) bulgularıyla uyumludur. Deney gruplarından 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF (E110) enjekte edilen yumurtalardan çıkan civcivlerde bursa Fabricii'nin embriyonik gelişiminin baskılanmış olduğu tespit edilmiştir. Bu hayvanlarda, bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin kontrol gruplarındakinden daha küçük olmasının yanı sıra, foliküllerdeki lenfosit yoğunluğunun daha düşük olduğu tespit edilmiş; ACP-az pozitif lenfositlere de seyrek olarak rastlanmıştır. Fonksiyonel bulgularla desteklenmemiş olmakla, elde edilen morfolojik sonuçlar, Sunset Yellow FCF (E110) verilen hayvanların humoral immün sistemlerinde önemli yetmezliklerin meydana gelebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada yapılan incelemelerde, kontrol gruplarında timusun embriyonik gelişiminin, daha önceki araştırıcıların Sandıkçı ve Çelik (2000) bulgularıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Deney gruplarında ise örnek alınan embriyonik dönemlerin tamamında organda gelişim geriliği tespit edilmiş olup, 1,000 ng/yumurta dozunda Sunset Yellow FCF(E110) enjekte edilen grupta timus loplarının gelişimindeki gerileme daha belirgindir. Bu grupta, organ kesitlerinde ANAE-pozitif olgun T lenfositlere de daha az sayıda rastlanmıştır. Bu sonuçlar, 1,000 ng/yumurta dozunda enjekte edilen Sunset Yellow FCF'nin (E110) hayvanların hücresel savunma sisteminde önemli bozukluklara yol açabileceğini düşündürmektedir.

Sunset Yellow FCF'nin (E110) immünotoksik etkileri üzerinde yapılan bir çalışmada, (Güler ve Başımoğlu 2013), Sunset Yellow FCF (E110)'nin tavuk embriyosu mast hücresi degranülasyonu üzerindeki etkisi, 2.5 mg/kg dozundaki boyanın kuluçkanın 15. gününde vitellüs kesesine enjekte edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla, enjeksiyondan 6 12 ve 24 saat sonra dermal ve mukozal mast hücrelerindeki degranülasyon incelenmiştir. Dermal mast hücrelerinin kısmi degranülasyonu Sunset Yellow FCF enjeksiyonundan 12 saat sonra, mukozal mast hücrelerininki ise 6 saat sonra gerçekleşmiştir. Deride en fazla degranülasyon enjeksiyondan 24 saat sonra, bağırsakta ise 12 saat sonra gerçekleşmiştir. Çalışma, Sunset Yellow FCF'nin (E110) alerjik reaksiyonlarda temel rolü olan mast hücrelerinin degranülasyonu üzerindeki etkisini ortaya koyduğundan, bu maddenin alerjik reaksiyonlara neden olabileceğini ortaya koymasın bakımından önemlidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; gıda boyası olarak yaygın biçimde kullanılan ve alerjik reaksiyonlara yol açtığı ileri sürülen Sunset Yellow FCF (E110), kuluçka başlangıcınıda yüksek konsantrasyon da hava kamarasına enjekte edildiğinde kanatlı merkezi lenfoid organları olan tavuk timus ve bursa Fabriciisinin embriyonik gelişimini baskılamaktadır. Her ne kadar, bu çalışmada elde edilen morfolojik bulguların fonksiyonel bulgularla desteklenmesine gerek varsa da, son yıllarda çocuklarda alerjik rahatsızlıkların artış göstermesi dikkate alındığında, gıda katkı maddelerinin ve özellikle de gıda boyalarının tek başlarına veya kombine etkilerinin bu artıştan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Konunun aydınlatılmasında memeli hayvan modeli üzerinde daha detaylı araştırmalara gerek olmakla birlikte; en azından puberti öncesi çocuklarda ve erken gebelikte sentetik gıda katkı maddesi ve özellikle gıda boyaları içeren hazır gıdaların kullanılmaması ya da kullanımının sıkı denetim altına alınması gerektiği önerilebilir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sunset Yellow FCF'nin (E110) Tavukların Timus ve Bursa Fabriciisinin Embriyonik Gelişimi Üzerindeki Etkisinin Histolojik ve Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

Elif Ayşe BERKTAY

Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında kuluçkalık yumurtaların hava kamarasına enjekte edilen farklı dozlardaki Sunset Yellow FCF'nin (E110) tavuk embriyolarında timus ve bursa Fabricii'nin embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik, histomorfometrik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Çalışmada, Bursa Hastavuk İşletmesinden temin edilen Ross 508 hattı broyler anaçlardan elde edilen; 250 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar, her birinde 50 yumurta bulunan 5 gruba ayrıldı.

Gıda boyası olarak yaygın biçimde kullanılmakla birlikte, son yıllarda alerjik reaksiyonlara yol açtığı konusunda şikâyetler artan Sunset Yellow FCF (E110), merkezi lenfoid organlar olan tavuk timus ve bursa Fabriciisinin embriyonik gelişiminde geriliğe neden olmaktadır. Her ne kadar bu çalışmada elde edilen morfolojik bulguların fonksiyonel bulgularla desteklenmesine gerek olmakla birlikte, son yıllarda alerjik rahatsızlıkların çocuklarda artış göstermesi dikkate alındığında, gıda katkı maddelerinin tek başlarına ya da kombine etkilerinin bu artıştan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Konunun aydınlatılmasında memeli hayvan modeli üzerinde daha detaylı araştırmalara gerek olmakla birlikte, en azından puberta öncesi çocuklarda ve gebeliğin erken döneminde sentetik gıda katkı maddesi ve özellikle gıda boyaları içeren hazır gıdaların kullanılmaması ya da kullanımının sıkı denetim altına alınması gerektiği önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: bursa Fabricii; sunset yellow FCF(E110); timus

7. SUMMARY

Determination of the Effects of Sunset Yellow FCF (E110) on the Embryonic Development of Chicken Thymus and Bursa Fabricii by Means of Histological and Enzyme Histochemical Methods

In this study, the effects of different doses of Sunset Yellow FCF (E110) on embryonic development of thymus and bursa of Fabricius were determined by means of histological, histomorphometrical and histochemical methods. The substance was injected into air sac of fertilized chicken eggs prior to incubation process.

The Ross 508 eggs obtained form Hastavuk, Bursa were divided into 5 groups, each having 500 eggs.

Although Sunset Yellow FCF (E110) has largely been used as food coloring agent, which complaints accumulated about the possibility of its allergenicity, caused to developmental delay in central lymphoid organs, thymus and bursa of Fabricius of the chicken. Although morphological results of this study require functional support, in regarding the increase in childhood allergic reactions, it has been suggested that food additives might be questioned for the increase. Detailed studies including the mammalian animal model is required to elucidate the topic, it might be recommended that consuption of fast food containing food additives and especially food colors containing foods, should be limited or used under strictly- controlled conditions.

Key Words: bursa of Fabricius; sunset yellow FCF(E110); thymus

8. KAYNAKLAR

1. Backman DE. Development of Thymus. Micros Res Tech. 1997;38:209-215.

2. Baer R, Leider LM, Mayer RL. Possible eczematous cross-hypersensitivity between p-phenylenediamine and azodyes certified for use in foods, drugs and cosmetics. Proc Soc Exp. Biol. 1948;67:489-494 (as referred to by JECFA, 1982).

3. Bär F, Griepentrog F. Die Allergenwirkung von Fremden Stoffen in den Lebensmitteln. Med u Ernahr. 1960;1:99-104 (as referred to by JECFA, 1982).

4. Berka T, Anderson PJ. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosaniline as a coupler. J Histochem Cytochem.1962;10:741-752.

5. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L. Cytochemical Study of Thymocytes and T Lymphocytes. Br J Haematol.1980;44:577-582.

6. Bockman DE, Cooper MD. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the Bursa of Fabricus, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. Am J Anat. 1973;136:455–478

7. Bonser GM, Clayson DB, Jull JW. The induction of tumours of the subcutaneous tissues, liver and intestine in the mouse by certain dyestuffs and their intermediates. Brit J Cancer. 1956;10: 653 (as referred to by JECFA, 1982).

8. Brown GW, Andrews B, Harris T, Adler Z, Bridge L. Social support, self-esteem and depression. Psychological Medicine. 1986;16:813-831

9. Carlson BM. Patten’s Foundations of Embriyology. Fourth Edition. NewYork, Mc Graw-Hill Book Company, 1981;425-439.

10. Catowsky D. Leucocyte cytochemical and immunological techniques. In: Dacie JV, Lewis SM, editors. Practical Haematology, 7th edition. Churchill Livingstone: 1981;143-174.

11. Ciriaco E, Pinera PP, Diaz-Esnal B, Laura R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). Microsc Res Tech. 2003;62:482–487.

12. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. London. Butterworths and Co Ltd. 1985;164-80

13. Çelik İ, Aştı RN, Ergene N. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. SÜ Tıp Fak Derg.1991;7:497-503.

14. Çelik İ, Aştı RN, Boyraz MÜ. Sığır fötal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. SÜ Vet Fak Derg. 1992;8: 41–44.

15. Çelik I, Oguz H, Demet O, Boydak M, Donmez HHM, Sur E, Nizamlioglu F. Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. British Poultry Science.2000;41(4):430-439.

16. Daniel JW. The excretion and metabolism of edible colours. Toxicol Appl Pharmacol. 1962;4:572-594 (as referred to by JECFA, 1982).

17. DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft. Bad Godesberg. Federal Republic of Germany. Farbstoff Kommission 1957 Mitteilung 6 (as referred to by JECFA, 1982).

18. Diker KS. İmmunoloji. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayın Serisi, 1998;33:4.

19. Durnev AD, Oreshchenko AV, Kulakova AV, Beresten NF. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. Vopr Med Khim. 1995;41:50-53 (as referred to by TemaNord, 2002).

20. EC. Report on Methodologies for the Monitoring of Food Additive Intake Across the European Union. Final Report Submitted by the Task Coordinator 16 January 1998, Reports of a Working Group on Scientific Cooperation on Questions Relating to Food. Task 4.2. SCOOP/INT/REPORT/2 1998(Brussels: European Commission Directorate General I11 Industry).

21. Ershoff BH. Effects of diet on growth and survival of rats fed toxic levels of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) and sunset yellow FCF (FD & C Yellow No. 6). The National Center for Biotechnology Information. 1977; 107:822-8.

22. Eroğlu HE, Kuş E. Renklendirici gıda katkı maddelerinden brıllıant blue ve sunset yellow'un insan periferal lenfosit kültürlerinde genotoksik etkilerinin araştırılması. Bozok Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans.2013;48

23. FDA. Summary of toxicity data on colours: FD and C Yellow No. 6. Unpublished report from the U.S. Food and Drug Administration.1964 (as referred to by JECFA, 1982).

24. Fuglsang G, Madsen G, Halken S, Jørgensen S, Ostergaard PA, Osterballe O. Adverse reactions to food additives in children with atopic symptoms. Allergy. 1994;49:31-7.

25. Fuglsang G, Madsen C, Saval P, Osterballe O. Prevalence of intolerance to food additives among Danish school children. Pediatr Allergy Immunol. 1993;4:123-9.

26. Garner RC, Nutman CA. Testing of some azodyes and their reproduction products for mutagenicity using *S. typhimurium* TA 1538. Mutation Res.1977;44:9-19 (as referred to by JECFA, 1982).

27. Gaunt IF, Farmer M, Grasso P, Gangolli SD. Acute (rat and mouse) toxicity studies on sunset yellow FCF. Fd Cosmet Toxicol. 1967;5:747-754 (as referred to by JECFA, 1982).

28. Gaunt IF, Mason PL, Grasso P, Kiss IS. Long-term toxicity of sunset yellow FCF in mice. Fd Cosmet Toxicol. 1974;12:1-10 (as referred to by JECFA, 1982).

29. Ghoreishi SM, Behpour M, Golestaneh M. Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode. Food Chemistry.2012;132:637-641

30. Glick B. Experimental Modification of the Growth of the Bursa of Fabricius. Poultry Science.1956;36:18-23.

31. Glick B. The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis. Int Rev Cytol.1977;48:345-355.

32. Glick B, Olah 1. The morphology of the Starling (Sturnus vulgaris) bursa of Fabricius: A scanning and light microscope study. Anat Rec.1982;204: 341-348.

33. Glick B. The ontogeny and microenvironment of the Avian Thymus and Bursa of Fabricius: Contribution of specialized cells to the Avian immuna response. Adv Vet Sci and Comp Med.1985;30: 67-90.

34. Glick B. Bursa of Fabricius, Development, growth, modulation and endocrine function. CRC Critic Rew Poult Biol.1988;1:107-132.

35. Graham RC, Allmark MG. Screening of some food colours for estrogenic activity. Toxicol, appl, Pharmacol. 1959;1:144-146 (as referred to by JECFA, 1982).

36. Graczyk S. The effect of single dose of sheep's erythrocytes on the avtivity of acid phosphatase in lymphocytes of peripheral blood in bursectomized chickens. Folia Histochem Cytobiol.1984;22:85-89

37. Graczyk S. Cytochemical examination of peripheral blood lymphocytes in bursectomized chichens. Folia Histochem Cytobiol.1987;25:45-49

38. Graczyk S. The effect of anti-bursa serum (ABS) on the intensity of acid phosphatase reaction in bursa dependent structures of the spleen and on the level of antibodies in the blood serum. Arch Vet Pol. 1994;34:1-2.25-36.

39. Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature.1962;21:292.

40. Güler T, Başımoğlu KY. Sunset Yellow Fcf' Nin Tavuk Embriyosu Deri Ve Barsak Mast Hücrelerinin Degranülasyonu Üzerindeki Etkileri. Kafkas Uni Vet Fak Derg. 2013;19:851-856

41. Hannuksela M, Haahtela T. Hypersensitivity reactions to food additives. Allergy. 1987;42:561-575.

42. Hashimoto Y, Sugimura M. Hıstologıcal and quantıtatıve studıes on the postnatal growth of the thymus and the bursa of fabrıcıus of whıte pekın ducks. Jap J Vet Res.1976;24:65-76.

43. Hassa O, Evcil Kanatlılarda Tavukların Bursa Fabricii'si Üzerinde Ontogenetik Araştırmalar ve organın hemopoietik karakteri. AÜ Vet Fak. 1955.

44. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FGJ. Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. Scand J Haematol. 1977;18: 437–448.

45. Hirota Y, Suzuki T, Chazano Y, Bito Y. Humoral immune responses characteristic of testosterooe-propionate-treaıed chickens. Immunol. 1976;30:341-348.

46. Hodges RD. The Histology Of The Fowl. London. Academic Pres Inc. 1974

47. Honohan T, Enderlin FE, Ryerson BA, Parkinson TM. Intestinal absorption of polymeric derivatives of the food dyes sunset yellow and tartrazine in rats. Xenobiotica. 1977;7:765-774 (as referred to by JECFA, 1982).

48. IRDC (International Research and Development Corporation). FD & C Yellow No. 6.Teratology study in rats. Unpublished report submitted to the Inter-Industry Colour Committee.1972a;306-004 (as referred to by JECFA, 1982).

49. IRDC (International Research and Development Corporation). FD & C Yellow No. 6. Teratology study in rabbits. Unpublished report submitted to the Inter-Industry Colour Committee, 1972b;306-003 (as referred to by JECFA, 1982).

50. Ishidate MJr, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food Chem Toxicol.1984;22:623-36.

51. Ivett JL. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1989;14:165–187.

52. JECFA, 26th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, 1982;17.

53. Jelinek R. The chick embryotoxicity screening test (CHEST). Methods in prenatal toxicology.1977:381-386

54. Jelinek R, Peterka M, Rcyter Z. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. Indian J Exp Biol. 1985;23:588-595.

55. Kajikawa O, Koyama H, Yashikawa T, Tsubaki S, Saito H. Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. Am J Vet Res. 1983;44:1549-1552.

56. Kaplow LS, Burstone MS. Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haemapoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques. J Histochem Cytochem.1964;12:805-811.

57. Kelly DE, Wood RL, Enders AC. Baily's Textbook of Micriscopic Anatomy. 18th edition. London. Williams and Wilkins Baltimore. 1984.

58. Kemper FH, Luepke NP. Toxicity testing by the hen's egg test(HET). Fd Chem Toxic.1986;24:647-648.

59. Knowles DM, Hoffman HT, Ferrarini M, Kunkel HG. The demonstration of acid α-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. Cell Immunol.1978a;35:112–123.

60. Knowles DM, Holck S. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid a-naphthyl acetat esterase. Lab Invest.1978b;39:70-76.

61. Kocaöz N, Çelik İ, Ünsal S. Tavuk Bursa Fabricii'sinin Embriyonal Gelişmesi Üzerinde Işık Mikroskopik Çalışmalar. Vet Bil Derg. 1997;13:43-51.

62. Konuk T. Pratik fizyoloji. A.Ü. Veteriner Fak. Yay. Ankara. 1981;378:276.

63. Kornbrust D, Barfknecht T. Testing of 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the in vitro and the in vivo/in vitro rat hepatocyte primary culture DNA repair assays.1985;7:101–120

64. Kuno N, Mizutani T. Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. J Toxicol Environ Health A. 2005;68:1431-1444.

65. Latshaw WK. Mesenteries and compartmentalizasyon In Veterinary Developmental Anatomy. Pennsylvania.1987:169-180

66. Le Douarin NM, Dieterlen-Uevre F, Oliver PD. On togeny ol primary Iymphoid organs and Iymplıoid stern cells. Am J Anat. 1984;170:261-299.

67. Li CY, Yam LT, Crosby WH. Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen. J Histochem Cytochem. 1972;20-12: 1049–1058.

68. Lowry MD, Hudson CF, Callen JP. Leukocytoclastic vasculitis caused by drug additives. J Am Acad Dermatol. 1994;30:854-855 (as referred to by TemaNord, 2002).

69. Lu FC, Lavallée A. The acute toxicity of some synthetic colours used in drugs and foods. Canad Pharm J. 1964;97:30 (as referred to by JECFA, 1982).

70. Lupetti M, Dolfi A. Gianessi F, Bianchi F, Michelucci S. Reappraisal of histogenesis in the bursal lymphoid failiele of the chicken. Am j Anat. 1990;187:287-302.

71. Lück H, Rickerl E. Food additives and mutative effects. VI Report, Z. Lebesmitt.-Untersuch. 1960;112:157-174.

72. Maskar Ü. Embriyoloji Ders Kitabı. 5.baskı. İstanbul, Sermet Matbaası.1976.

73. Marmion DM. Handbook of US colorants: foods, drugs, cosmetics, and medical devices. 1991;21

74. Manchon PH, Lowy R. Effet pseudovitaminique du jaune soleil sur la croissance du rat. Fd Cosmet Toxicol. 1964;2:453-456

75. Mannell WA, Grice HC, Lu FC, Allmark MG. Chronic toxicity studies on food colours. Part IV – Observations on the toxicity of tartrazine. amaranth and sunset yellow in rats. J Pharm Pharmacol. 1958;10:625

76. Mathur NRA, Chaudhary V, Mehta M, Krishnatrey R. Effect of Sunset Yellow on testis in rats. J Ecophysiol Occup Health. 2005a;5:1-3.

77. Mathur NRA, Chaudhary V, Mehta M, Gupta S. Sunset yellow induced changes in the lipid profile in male albino rat. Biochemical Cell.2005b;5:197-200

78. Maiti NK, Saini SS, Sharma SN. Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. Vet Res Commun. 1990;14:207-210.

79. McCann D, Barrett A, Cooper C, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, O'Warner J, Stevenson J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. The Lancet.2007;370:1560-1567.

80. McLelland J. A colour atlas of avian anatomy. Record Number 19912253859.1990;127:0-7234-1575-7.

81. Michael J, Ratcliffe H. The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. lmmunol Taday.1985:6-7;223-226.

82. Mikkelsen H, Larsen JC, Tarding F. Hypersensitivity reactions to food colours with special reference to the natural colour Annatto extract (butter colour). Archs Toxicol Suppl.1978;1:141.

83. Moriya O, Ichikawa Y. Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos. ActaHistochem. 1989; 87: 99-105.

84. Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur J Immunol.1975;5:270-274.

85. Natıonal Toxıcology Program(NTP). Carcınogenesıs Bıoassay Of 2,3,7,8-Tetrachlorodıbenzo-P-Dıoxın (Cas No. 1746-01-6) In Swıss-Webster Mıce. Technical Report Series.1981;201

86. Olah 1, Glick B, Törö 1. Sursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. Poultry Sci.1986;65: 474-488.

87. Olah 1, Glick B. Follicle-associated epitelium and medullary epithelial tissue of the bursa of fabricius are two different compartments. Anat Rec. 1992;233:577-587.

88. Olah I, Glick B. Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not demsin. The Anatomical Record.1995;243:384–389

89. Osman IH. Metastrategy simulated annealing and tabu search algorithms for the vehicle routing problem. Annals of Operations Research. 1993;41:421-451

90. Pierce EC. Multigeneration reproduction studies with certified colours in rats. Inter- Industry Colour Committee Task Force, Cosmetic Toiletry and Fragrance Association, Washington, D.C. Abst. XIII Ann. Meeting of Toxicol. Appl. Pharmacol. 1974;29:121 (as referred to by JECFA, 1982).

91. Poul M, Jarry G, Elhkim MO, Poul JM. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth. sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. Food and Chemical Toxicology.2009;47:443-448

92. Prelusky DB, Hamilton RM, Foster BC, Trenholm HL, Thompson BK. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. Association of Official Analytical Chemists.1987; 70:1049-1055

93. Pruthi AK, Gupta RKP, Sanada JR. Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens. J Vet Med. 1987;34:390-392

94. Price PJ, Suk WA, Freeman AE, Lane WT, Peters RL, Vernon ML, Huebner RJ. In vitro and in vivo indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. Int J Cancer. 1978;21:361

95. Radomski JL, Mellinger TJ. The absorption, fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes. FD & C red No. 2. FD & C red No. 4 and FD & C Yellow No. 6. J Pharmacol exp Ther. 1962;136:259-266

96. Ranki A. Non-spesific esterase activity in human lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol. 1978;10: 47–58.

97. Ramos JA, Ramis AJ, Marco A, Domingo M, Rabanal R, Ferrer L. Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. Am J Vet Res. 1992;53: 1418–1426.

98. Ratcliffe MJH. The ontogeny and don ing of B cells in the bursa of Fabricius. Immunol.1985;6-7:223-227.

99. Re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E E110) as a food additive EFSA Journal 2009;7: 18-1330

100. Ryan AJ, Wright SE. The excretion of some azodyes in rat bile. J Pharm Pharmacol. 1961;13: 492

101. Saifuddin M, Manktelow BW, Moriarty KM, Christensen NH, Birtles MJ. Age-related functional changes in the follicle-associated epithelium of the bursa of Fabricius in shaver cockerels. New Zealand Vet Journal.1988;36: 1 08-111.

102. Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji. 6. Baskı, Ankara. Yorum Matbaacılık, 2001;221:2.

103. Sandıkçı M, Çelik İ. Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetatın bu organ üzerine etkisi. Vet Bil Derg.2000;16:81-88

104. Sankaranarayanan N, Murthy MSS. Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. Mutation Res. 1979;67:309-314 (as referred to by JECFA, 1982).

105. Sasaki YuF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa Kazumi, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2002;519(1–2):103–119

106. Schultz-Ehrenburg U, Gilde O. Results of studies in chronic urticaria with special reference to nutritional factors. Z Hautkr. 1987;62:88-95 (as referred to by TemaNord, 2002).

107. Seymour GJ, Dockrell HM, Greenspan JS. Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease. Clin Exp Immunol.1978;32: 169–178.

108. Shaul Y, Unger T. The X protein of the hepatitis B virus acts as a transcription factor when targeted to its responsive element. The EMBO journal. 1990;9:6

109. Shiojiri N, Takahishi M. Lymphoid failiele formatian in the bursa of Fabricius of the chick embryo. J Anat.1991;175:237-249.

110. Slowik J, Kuryszko J, Graczyk S, Kuprowski M. Histochemical studies of acid phosphatase in the bursa-dependent lymphoid tissue of the spleen of chickens after bursectomy and stimulation with ovine erythrocytes. Pol Arch Weter. 1990;30: 75-87.

111. Supramaniam G, Warner JO. Artificial food additive intolerance in patients with angio-oedema and urticaria. Lancet. 1986;2:907-9.

112. Sur E, Celik İ. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. British Poultry Science. 2003;44:558-566.

113. Sornin de Leysat C, Boone M, Blondeel A, Song M. Two cases of cross-sensitivity in subjects allergic to paraphenylenediamine following ingestion of Polaronil. Dermatology 2003;206:379-80.

114. Pierce EC. Multigeneration reproduction studies with certified colours in rats. Inter-Industry Colour Committee Task Force, Cosmetic Toiletry and Fragrance Association, Washington, Abst. XIII Ann. Meeting of Toxicol. Appl. Pharmacol.1974;29:121 (as referred to by JECFA, 1982).

115. Tamaoki N, Essner E. Distribution of acid phosphatase, β-glucuronidase and N-acetyl-β-glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents. J Histochem Cytochem. 1969;17 (4): 238–243.

116. TemaNord, Food additives in Europe 2000; Status of safety assessments of food additives presently permitted in the EU. TemaNord. 2002;560:65-69.

117. Tennant D. Screening of Colour Intakes from Non-Alcoholic Beverages. Report prepared for the Union of European Beverages Associations (UNESDA).2006.

118. Valinski JE, Reich E, Le Douarin NM. Plasminogen activator in the bursa of Fabricius: Corrlations with morphogenetic ramodeliing and cell migrations. 1981; 25: 471-476.

119. Verret MJ, Marliac JP, McLoughlin J. The use of chick embryo in the assay of aflatoxin toxicity. JAOAC.1964;47(6):1003-1006

120. Vesely D, Vesela D. Use of chick embryos for prediction of embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. Vet Med (Praha). 1991;36(3):175-81

121. Viola M, Nosotti A. Application of the Ames test on some dyes. Boll Chim Farm.1978;117:402 (as referred to by JECFA, 1982).

122. Westmoreland C, Gatehouse DG. The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and FD & C Yellow No. 6 in vivo in the rodent micronucleus test (observations on species and tissue specificity). Carcinogenesis.1991;12:1403-1407.(as referred to by TemaNord, 2002).

123. Willheim R, Ivy AC. A preliminary study concerning the possibility of dietary carcinogenesis. Gastroenterology. 1953;23:1-19 (as referred to by JECFA, 1982).

124. Wilson N, Scott, A. A double-blind assessment of additive intolerance in children using a 12 day challenge period at home. Clin Exp Allergy. 1989;19:267-72.

125. Wulff JC, Sale GE, Deeg HJ, Storb R. Nonspesific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. Exp Hematol.1981; 9(8):85-870.

126. Worm M, Ehlers I, Sterry W, Zuberbier T. Clinical relevance of food additives in adult patients with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2000;30:407-414.

127. Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ, Rappaport H. Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. Am J Clin Pathol. 1982;78.2:141-149.

128. Yentür G, Karakaya AE. Kullanımı yasaklanan aromatik azo yapısındaki gıda boyalarının bazı gıda maddelerinde araştırılması. Gıda. 1985;10 (6):371-376.

129. Young E, Patel S, Stoneham M, Rona R, Wilkinson JD. The prevalence of reaction to food additives in a survey population. J R Coll Physicians Lond. 1987;21:241-7.

130. Zicca A, Zeprini A, Cadoni A, Franzi AT, Ferrarini M, Grossi CE. Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human Tm lymphocytes. Am J Pathol. 1981;105 (1): 40–46.

10. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra, 2011 yılında Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliğinden mezun oldu. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.