T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KULUÇKADA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ISI STRESİNİN BROYLERLERDE İNCE BAĞIRSAĞIN EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOKİMYASAL, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE HİSTOMETRİK METOTLARLA BELİRLENMESİ

Tuğba ÖZAYDIN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KULUÇKADA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ISI STRESİNİN BROYLERLERDE İNCE BAĞIRSAĞIN EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOKİMYASAL, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE HİSTOMETRİK METOTLARLA BELİRLENMESİ

Tuğba ÖZAYDIN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06102035 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2009

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yakın ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elemanlarına, bu çalışmada kullanılan kuluçkalık yumurtaların temin edilmesini sağlayan Veteriner Hekim Yiğithan Uzun ve Keskinoğlu Tavukçuluk ve Damızlık İşletmeleri San. Tic. A.Ş.'ye, çalışmayı destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (BAP Proje No: 06102035) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR……...v
1. GİRİŞ……...1
1.1. Kuluçka İşlemi Sırasında Embriyo Gelişimini Etkileyen Çevresel Faktörler…...1
1.1.1. Kuluçka Sıcaklığı……2
1.1.2. Çevirme……...3
1.1.3. Nem Seviyesi……..3
1.1.4. Havalandırma……..4
1.2. Civcivlerde İnce Bağırsağın Morfolojik ve Fonksiyonel Gelişimi……5
1.2.1. İnce Bağırsağın Yapısal Gelişimi……...5
1.2.2. Gelişen İnce Bağırsakta Kript Oluşumu, Entorosit Proliferasyonu ve Göçü….7
1.2.3. Bağırsak Mukozasında Sindirim ve Emilim Fonksiyonlarının Gelişimi……...8
1.2.4. Kadeh Hücrelerinin Gelişim ve Fonksiyonu…….11
1.2.5. Enteroendokrin Hücreler……...13
1.3. Strese Hücresel Yanıt ……..15
1.3.1. Apoptozis……..16
Apoptozis Modülatörleri……19
Apoptozisin Tetiklenmesi……...22
1.3.2. Isı Şoku Proteinleri……...23
1.3.3. Termotolerans ve Apoptozis İndüksiyonunda Ortak Sinyaller……28
1.3.4. Apoptozisin Regülasyonunda Isı Şoku Proteinlerinin Rolü…….30
2. GEREÇ VE YÖNTEM……33
2.1. Gereç……...33
2.1.1. Kuluçkalık Yumurtalar……33
2.2. Yöntem……...33
2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Kuluçka İşlemi…….33
2.2.2. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması…….34
2.2.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar……..34
2.2.4. Enzim Histokimyasal Boyamalar……38
2.2.5. Değerlendirme ve İstatistiki Analizler…….39
3. BULGULAR……40
3.1. Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular……...40

3.2. İnce Bağırsağın Histolojik Gelişimi ve Villuslardan Elde Edilen Histometrik Veriler……43
3.3. Kadeh Hücreleri Üzerinde Yapılan İnceleme Sonuçları…….50
3.4. Enteroendokrin Hücreler Üzerinde Yapılan İnceleme Sonuçları……....55
3.5. Apoptozis Bulguları…….60
3.6. PCNA Bulguları……..62
3.7. Hsp70 Bulguları……..65
3.8. ALP Demonstrasyonu Bulguları…….71
3.9. Sükraz İzomaltaz Demonstrasyonu Bulguları……76
4. TARTIŞMA……..80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…….95
6. ÖZET…….97
7. SUMMARY……..99
8. KAYNAKLAR……100
9. ÖZGEÇMİŞ……110

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB: Alcian Blue

AIF: Apoptosis Inducing Factor

ALP: Alkalen Fosfataz

AP: Aminopeptidaz

Apaf-1: Apoptotic Protease Activating Factor-1

APUD: Amine Precursor Uptake and Decarboxylation

CAD: Caspase Activated Deoxyribonuclease

CTL: Sitotoksik T Lenfosit

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

FADD: Fas Associated Death Domain, Fas İlişkili Ölüm Bölgeleri

FASL: Fas Ligand

HSE: Heat Shock Element, Isı Şoku Elementi

HSF: Heat Shock Factor, Isı Şoku Faktörü

HSP: Heat Shock Protein, Isı Şoku Proteini

IAP: Inhibitory Apoptotic Protein

ICAD: Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease

JNK: c-Jun N-terminal Kinaz

NK: Natural Killer

NOR: Nucleolar Organizer Region

PAS: Periodic Acid Schiff

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PP: Pankreatik polipeptid

RIP: Receptor Interacting Protein

ROS: Reactive Oxygen Species

SAPK: Stress Activated Protein Kinase

SGLT1: Sodyum-Glukoz Transporter 1

SI: Sükraz-izomaltaz

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRADD: TNFR1 Associated Death Domain, TNFR1 İlişkili Ölüm Bölgeleri

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP_biotin nick end labeling

VIP: Vazoaktif Intestinal Peptid

1.GİRİŞ

1.1. Kuluçka İşlemi Sırasında Embriyo Gelişimini Etkileyen Çevresel Faktörler

Hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşması gibi olayların yüksek hızda gerçekleşmesi nedeniyle, ister memeli, isterse de kanatlı olsun bütün hayvan türlerinde prenatal dönem gelişmekte olan bir canlının zararlı etkilere en duyarlı olduğu dönemdir. Bu nedenle, prenatal dönemin özellikle prediferensiyasyon ve erken organogenezis evreleri optimal koşullar altında sürdürülmelidir. Ovipar bir tür olan tavuklarda, prenatal yaşamın blastula aşamasının sonuna kadarki erken evreleri dişi oviduktunda gerçekleşmekte; hücre diferensiyasyon olaylarının önemli bir kısmı ve organogenezis ile organların anatomik büyümesi ve fonksiyonel olgunlaşması ise kuluçka aşamasında sürmektedir. Kanatlıda kuluçkanın ve hatta çıkış sonu gelişimin başarısı, genotip ve kuluçka öncesi faktörler yanında kuluçka makinesi iç ortam koşullarından da önemli oranda etkilendiğinden, kuluçka makinesi koşullarının optimal değerlerde tutulması hayati öneme sahiptir (Çelik 2008).

Tavuklarda verimi artırmada genotipin önemi iyi bilindiğinden, yıllarca sürdürülen genetik ıslah çalışmalarıyla yumurtacı ve etçi (broyler) olmak üzere iki farklı ticari tavuk ırkı geliştirilmiştir. Broyler sektöründe, besleme dönemindeki günlük canlı ağırlık kazancında sağlanan ve gramlarla ifade edilen artışlar, firmalara önemli ekonomik kazanç sağladığından, bakım ve besleme koşulları performans artırıcı faktörler arasındaki önemini korumakta ve hala üzerinde yoğun biçimde çalışılmaktadır. Özellikle canlı ağırlık kazancının artırılmasına yönelik çalışmalarda, bir yandan yedirme dönemindeki bakım-beslemeyle sürünün sevk ve idaresi yöntemleri üzerinde durulurken, diğer yandan da kuluçka makinesi koşullarının etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Zira, kuluçka makinesi koşullarının, gerek embriyonik ve gerekse de çıkış sonu gelişme üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler yetersizdir (De Smit ve ark 2006).

Kuluçka sürecinde makine içi sıcaklığı ile nem, havalandırma ve çevirme gibi parametreler, civcivlerin çıkış gücü ve kalitesini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Bu faktörlerden makine içi sıcaklık yani kuluçka sıcaklığı, diğer faktörlerin etkilerinin ortaya çıkışında da etkin olduğundan, etkisi en belirgin olan faktördür (İpek ve ark 2003).

1.1.1. Kuluçka Sıcaklığı

Yüksek çıkış kalitesi ve çıkış oranı sağlayan optimum kuluçka sıcaklığının kuluçka boyunca sürdürülmesi, kuluçka başarısını artırmada çok önemli bir koşuldur (Nakage ve ark 2003). Çoğu kanatlı türü için optimum kuluçka sıcaklığı 37-38^{o}C arasındadır ve bu optimum sıcaklıktan küçük sapmalar bile çıkış başarısı ve embriyo gelişimi üzerinde önemli olumsuz etkilere sahiptir. Bu nedenle ticari kuluçka makinelerinin, gelişmekte olan embriyonun vücut sıcaklığının optimal değerler arasında tutulması için makine içi sıcaklığını dar sınırlar arasında ve doğru olarak kontrol edebilecek (lineer ısıtma yapabilecek) şekilde tasarlanmış ve imal edilmiş olması gerekir (French 1997). Ayrıca, iç ortam havasının homojen dağılımı sağlanmalı, türbülansın engellenerek "sıcak bölgelerin" (hot spots) meydana gelmesi önlenmelidir (Anom 2009c).

Kanatlı embriyosu poikilotermik olduğundan yumurta çevresi sıcaklığının hassas bir şekilde kontrolü, gelişen embriyo için hayati öneme sahiptir (Van Brecht ve ark 2005). Embriyo sıcaklığı ya da yumurta içi sıcaklık; kuluçka makinesi sıcaklığı, yumurta ve çevresindeki havanın termal iletkenliği ile embriyonun metabolik ısı üretim hızıyla belirlenir. Kuluçkanın orta döneminden önceki günlerde, yani kuluçkanın erken döneminde (11. günden önce), buharlaşmanın vücut sıcaklığını düşürmesi nedeniyle embriyo sıcaklığı kuluçka makinesi iç sıcaklığından biraz daha düşüktür. Ancak kuluçka döneminin ortasından itibaren, embriyonun artan metabolik ısı üretimine bağlı olarak embriyo sıcaklığı makine sıcaklığından daha yüksek değerlere sahip olabilmektedir (French 1997).

Tavuk yumurtaları üzerinde yapılan çalışmalar, yüksek kuluçka sıcaklığının çıkış gücü üzerindeki olumsuz etkilerinin sıcaklık derecesi ve maruz kalınan sürenin artışıyla doğru orantılı olduğunu göstermektedir (Wilson 1991).

Kuluçka sıcaklık seviyesindeki optimumdan sapmalar sadece çıkış gücünü, embriyonik gelişimi ve civciv kalitesini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda çıkış sonrası performansı da olumsuz etkilemektedir (Lourens ve ark 2005, Joseph ve ark 2006).

1.1.2. Çevirme

Yumurtanın çevrilmesi, tavuklarda kuluçka sırasında görülen doğal bir fenomendir. Yapay inkübasyon böyle bir koşulun taklit edilmesi için mekanik çevirmeyi gerektirir. Çevirmede; çevirme sıklığı, yerleştirme ve çevirme ekseni, çevirme açısı, rotasyon derecesi ve inkübasyon safhası gibi çeşitli parametreler önemlidir (Tona ve ark 2003). Kuluçka makinelerindeki yumurtaların kuluçkanın 1 ile 18. günleri arasında uygun bir pozisyonda ve aralıklarla çevrilmeleri gerekir. Yumurtaların çevrilmesi önce bir tarafa sonra da diğer tarafa doğru olmalıdır. Yumurtalar asla tek yönde veya bir daire yapacak şekilde çevrilmemelidirler. Bu gibi çevirmeler allantois zarının yırtılmasına neden olabilir. En uygunu, yumurtaların düşey eksen ile 45^{o}'lik açı yapacak şekilde önce bir tarafa ve bir müddet sonra da diğer tarafa çevrilmesidir. Günde 8 veya 10 defa çevirme yeterlidir (Aksoy 1994). Çevirme işlemi embriyonik malpozisyonları azaltmakta, embriyo veya embriyonik membranların kabuk zarına yapışmasını önlemekte ve koriyoallantoisin yumurtanın sivri ucunu zamanında ve tam olarak kapatmasını sağlamaktadır. Civcivlerde yaygın olarak görülen malpozisyonlardan başın sivri uçta yer almasının hatalı yumurta oryentasyonu (örneğin küt ucun aşağı yerleştirilmesi), yetersiz çevirme sıklığı, uygun olmayan çevirme açısı ve kuluçkanın ilk haftasında çevirmenin yapılmamasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Elibol ve Brake 2006). Ayrıca çevirme, gelişen embriyonun albümini tam olarak kullanmasına da olanak sağlar. Çevirmenin amniyotik sıvıda protein akümülasyonu, area vaskülozanın gelişim oranı ve gaz değişimi üzerindeki fizyolojik etkileriyle ilgili bilgiler çevirme işleminin önemini vurgulamaktadır (Tona ve ark 2003).

1.1.3. Nem Seviyesi

Bir embriyonun gelişip kusursuz ve normal büyüklükte bir civciv haline gelebilmesi için, yumurtanın su içeriğinin uygun bir tempo ile buharlaşması gerekmektedir. Normal bir embriyonik gelişim için, yumurtanın kuluçkanın 19. gününe kadar her gün ağırlığının %0.55'ini kaybetmesi yeterli görülmektedir (Aksoy 1994). Kuluçka sürecinde yumurtanın kaybettiği su miktarı kuluçka makinesindeki nem seviyesi ile sıkı ilişkilidir. Kuluçka makinesindeki nem seviyesinin normalden yüksek olması durumunda yumurta içindeki suyun buharlaşmayla kaybı düşük düzeyde olacağından hava kamarası küçük, embriyo ise normalden daha iri ve

ödemli olacaktır. Böyle civcivlerin solunumu güçleşeceğinden, kabuğu kırması da zorlaşır. Makine içi nem seviyesinin normalden düşük olması durumunda ise buharlaşma hızlı ve yüksek düzeyde olacaktır. Bu durum, normalden küçük civcivlerin oluşumuna ve kabuk altı ölümlerin artmasına yol açacağından sonuç olarak her iki durumda da kuluçka randımanı önemli oranda düşecektir (Anom 2009a).

Kuluçka sürecinde yumurtaların su kayıplarının normal sınırlar içinde tutulabilmesi için kuluçka makinesi iç ortamının rölatif rutubeti %50-60 (ıslak termometre; %85-87) arasında olmadır. Makinenin çıkış bölmesinde rölatif rutubetin biraz daha yüksek olması uygundur. Yirmi ve 21. günlerde rölatif rutubet %75 (ıslak termometre; %90-94) civarında olmalıdır (Aksoy 1994).

1.1.4. Havalandırma

Embriyonik gelişim sürecinde kabuktaki porlar vasıtasıyla oksijen yumurta içine girerken, karbondioksit dışarı çıkar. Bu sayede embriyonun gelişirken ihtiyaç duyduğu temiz hava sağlanmış olur. Başarılı bir kuluçkada makine havasındaki oksijen oranının normal sınırlar arasında tutulmasını sağlamak için havalandırma çok önemlidir (Anom 2009b). Normal havanın CO_2 oranı yaklaşık olarak %0,5'tir. Makine havasının CO_2 oranının %1,5-2'yi aşması embriyonik ölümlere neden olurken, kuluçkanın 21. gününde makinedeki karbondioksit oranının %0,54'den biraz yüksek olmasının, civcivleri bir an önce yumurtadan çıkmak üzere uyarması nedeniyle faydalı olduğu öne sürülmektedir (Aksoy 1994).

Kronik hipoksi, kuluçkanın kritik safhalarında embriyonik gelişimi etkilemekte ve yapısal anomalilere yol açabilmektedir. Ayrıca, oldukça hassas bir kardiyovasküler sisteme sahip olan broyler civcivlerin kuluçka sırasında hipoksiye maruz kalmaları; bu hayvanları kuluçka sonrası yaşamlarında asites gelişimine predizpoze hale getirebilmektedir (De Smit ve ark 2006).

1.2. Civcivlerde İnce Bağırsağın Morfolojik ve Fonksiyonel Gelişimi

Kuluçkadan çıkan civcivler için çıkıştan önce karın boşluğuna çekilen yumurta sarısı birkaç gün için yegane besin kaynağı olmakla birlikte, bu erken dönemde hayvanlar hızla gelişmekte olduklarından dışarıdan besin alımına da ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle çıkış sonrası erken dönem, lipidden zengin olan yumurta sarısından, karbonhidrat ve proteinden zengin olan dış besine geçişle karakterizedir (Sklan 2001). Son yıllarda broylerlerin kesim yaşı azalırken, sarıdan dış besin alımına geçiş süresi giderek daha fazla önem kazanmıştır (Geyra ve ark 2001). Dışardan alınan besinlerin etkin bir şekilde kullanılabilmesi ise bağırsakların yapısal gelişim ve fonksiyonel matürasyonuna sıkı sıkıya bağlıdır. Besinlerin sindirim ve emilimi ile iskelet kası gibi hızlı gelişip büyüyen dokuların yapısına katılabilmesi direkt olarak bağırsak epitelinin fonksiyonel kapasitesine bağlıdır. Optimal kas gelişimi ve sonuçta optimal düzeyde et verimi elde edebilmek için enterositlerin gelişim, fonksiyonel matürasyon ve performanslarını maksimuma çıkarmak gereklidir (Uni 2006).

Dışardan alınan besine hızlı geçişe uyum sağlamak için, civciv ince bağırsağı hem kuluçkanın sonuna doğru ve hem de çıkış sonrası ilk günlerde önemli morfolojik, moleküler ve fonksiyonel değişikliklere uğrar (Uni 2006).

1.2.1. İnce Bağırsağın Yapısal Gelişimi

Bağırsak epitelinin yapısal gelişimi ve fonksiyonel matürasyonu, hem spesifik genlerin programlı ekspresyonu ve hem de epitelyal ve mezenşimal etkileşimler ile hormonal etkilere bağlı olarak epigenetik etkileşimlerle gerçekleşmektedir (Dauça ve ark 1990).

Omurgalılarda sindirim sistemi organlarının epiteli endodermden, bağ dokusu ise splanchnic mezodermden köken alan mezenşimden gelişmektedir. Tavuk embriyosunda, sağ ve sol splanchniyopleuralar orta hatta archenteron etrafında boydan boya kaynaşarak kuluçkanın 2-3. günlerinde kraniyo-kaudal doğrultuda uzanan tüp şeklinde bir kanal, yani ilk bağırsak boşluğunu oluştururlar. Kuluçkanın beşinci gününde sindirim kanalı özafagus, kursak, glandüler mide ve muskuler mide, ince ve kalın bağırsaklarla allontois olarak bölümlenmeye başlar. Gelişme

ilerledikçe, her organın epitel ve mezenşimi tedricen farklılaşarak organa spesifik özellikler kazanır. Özafagus epiteli çok katlı yassı bir özellik kazanırken, glandüler mide epiteli mezenşimal doku içerisine invagine olarak glandüler yapıları şekillendirir ve bez epitel hücreleri kuluçkanın 9. gününden itibaren tavuk embriyonik pepsinojen genini (ECP) eksprese etmeye başlar. Muskuler mide epiteli mukus salgılayan basit bezleri şekillendirir. İnce bağırsak epiteli de alttaki mezenşimle birlikte villusları oluşturarak sükraz gibi bazı fırça kenar enzimlerini salgılamaya başlar (Hiramatsu ve Yasugi 2004).

Bağırsak duvarını oluşturan tunika muskularis'in iç sirküler kas katmanı kuluçkanın 11. gününden önce şekillenmiş durumdadır ve kuluçkanın 16. gününde bölgedeki mezenşimin geri kalanı, dış longitudinal kas katmanı ile muskularis mukozaya farklılaşır (Sabatakou ve ark 2003).

Tavuk embriyosunda villusların şekillenmesi sırasında gerçekleşen erken dönem olayları, 1902 yılında Hilton tarafından tanımlanmıştır. Altı günlük embriyo duodenumu, yalancı çok katlı epitelin sınırlandırdığı dar lümenli bir tüp halindedir (Mamajiwalla ve ark 1992). Embriyoda belirgin villusların oluşumundan önceki epitel hücreleri kübik şekillidirler ve epitel, duodenumun boyuna eksenine paralel seyreden previllus kıvrımlarını oluşturmak üzere katlanır. Villus oluşumu senkronize bir tarzda değil, iki ardışık safhada gerçekleşmektedir. İlk safha kuluçkanın 13. gününde tamamlanmakta ve bu safhada 16 previllus kıvrımı oluşmaktadır. Bu safhada oluşan kıvrımlar oldukça üniformdur ve sonraki gelişimleri de eşzamanlı devam eder. Kuluçkanın 14 ve 16. günleri arasında, ilk safhada oluşan previllus kıvrımları tüm uzunlukları boyunca oldukça düzenli zikzaklar şeklinde katlanır. Onyedinci günde her bir zikzağın köşesinde lokalize olan kıvrımların tepesindeki hücre popülasyonunun çoğalmasıyla belirgin villuslar şekillenmeye başlar. Onsekizinci günde hücrelerdeki bu çoğalma her bir zikzağın uzunluğu boyunca yayılır ve 19. günden sonra villus taslakları çıkış sonrası karakteristik görünümleri olan parmak benzeri şekillerini kazanırlar. İkinci safha kuluçkanın 16. gününde başlamakta ve çıkışı takiben 4. günde tamamlanmaktadır. Bu safhada oluşan villuslar, previllus kıvrımlarının aralarındaki bağırsak duvarından dil benzeri oluşumlar halinde gelişirler. İkinci safhada oluşan villuslar da hızla gelişerek 19. günde belirgin şekillerini kazanırlar. Çıkışta; ikinci safhada gelişen villuslarla, birinci

safhada gelişen villuslar arasındaki tek fark boylarıdır ve ikinci safhada gelişen villuslar daha kısadır. Bununla birlikte, bu fark da çıkıştan sonraki 4. günde ortadan kalkar (Grey 1972, Sabatakou ve ark 2003).

Uni ve ark (2003a), kuluçkanın 17. gününde jejunumda villusların farklı şekil ve büyüklükte olan iki gelişim aşamasında olduklarını bildirmişlerdir. Villuslardan büyük olanların armut şekilli, küçük olanların ise daha dar ve roket şekilli olduğu, 18-19 günlük embriyolarda bu iki gelişim aşamasındaki villusların şekillerini ve dağılım oranlarını koruyarak boylarının uzadığı ifade edilmiştir. Ayrıca araştırıcılar (Uni ve ark 2003a), 19 günlük embriyoda mevcut olan villusların bazalinde tomurcuklanmalar olduğu ve bu tomurcukların hızla gelişerek tüm villusların %30'unu oluşturan yeni bir villus serisi oluşturduklarını bildirmişlerdir.

1.2.2. Gelişen İnce Bağırsakta Kript Oluşumu, Enterosit Proliferasyonu ve Göçü

Bağırsak epitelinde, kriptlerdeki proliferatif hücreler devamlı çoğalıp çoğunlukla enterositlere olmak üzere faklılaşarak villusların tepesine doğru göç ederler. Bu göç esnasında yaşlanan enterositlerin villus tepesinden lümene dökülmeleri sonucu bağırsaklarda sürekli bir yenilenme süreci gerçekleşir. Kriptlerden villus tepesine doğru gerçekleşen bu göç sürecinde hücreler farklılaşarak sindirim, emilim ve müsin sekresyonu fonksiyonlarını kazanırlar (Uni 2006).

Enterosit proliferasyon alanı ve enterosit göç oranları omurgalılar arasında farklılık gösterir. Çoğu memelide proliferasyon, villusların bazalindeki kriptlerle sınırlıdır. Villusların apeksine doğru göç eden hücreler fonksiyonel bakımdan özelleşerek bölünme yeteneklerini kaybederler. Bununla birlikte, amfibi ve kaplumbağa gibi aşağı omurgalılarda, proliferasyon mukozal kıvrımlar arasında gerçekleşir ve yüksek yapılı omurgalılardaki kadar belirgin proliferasyon bölgesi bulunmaz. Çoğu memelide, ince bağırsak kriptleri prenatal dönemde düz seyirli intervillus epitelinden gelişir. DNA sentezi ve hücre proliferasyonu doğumdan önce villusların tüm uzunluğu boyunca yaygınken, doğumdan sonra kript bölgesinde sınırlanır (Uni 2006). Kanatlılarda ise çıkış günü ince bağırsağın hemen hemen tüm enterositleri proliferatiftir; zamanla, proliferatif hücrelerin oranı hızla azalır ve çıkış sonrası 2-3. günlerde kriptlerde yaklaşık %50'ye ulaşır. İlginç bir şekilde, çıkış

sonrası 10. güne kadar proliferatif hücreler kript bölgesinde sınırlanmazlar ve villus boyunca mevcutturlar (Uni ve ark 1998b).

Kuluçkadan yeni çıkan civcivlerde, villus başına nispeten az sayıda hücre içeren tek bir kript gözlenir. Bu dönemden sonra kript sayısı, mevcut kriptlerin dallanmasıyla artar ve aynı zamanda kript bölgesinde hiperplazi gerçekleşir. Çıkıştan 4-5 gün sonra, kript gelişim hızı yavaşlar ve çıkış sonrası ikinci haftanın sonunda villus başına 3-4 kript gözlenir (Uni ve ark 2000, Geyra ve ark 2001).

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen): PCNA; 36 kD ağırlığında sadece hayvan hücrelerinde değil aynı zamanda bitki hücrelerinde de bulunan hücre siklusu ile ilgili nükleer bir proteindir (Avunduk ve ark 2000). DNA sentezini katalize eden, DNA tamirinde yer alan DNA polimeraz delta'nın kofaktörü PCNA'nın sentezi hücre siklusunun geç G1 fazında başlayarak orta-geç S fazında en yüksek değere ulaşmaktadır. Bu nedenle PCNA proliferatif hücrelerin tanınmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Şen ve ark 2002).

1.2.3. Bağırsak Mukozasında Sindirim ve Emilim Fonksiyonlarının Gelişimi

Tavuk embriyosunda bağırsağın fonksiyonel gelişimi memelilerden önemli derecede farklıdır. Kanatlılarda çıkış sonu erken dönemde dahi sindirim sisteminin, kompleks karbonhidratları sindirebilecek maturasyona sahip olması gereklidir (Uni ve ark 2003a). Bağırsağın mukoza katmanının çıkış öncesi dönem boyunca hızla değiştiği gözlenir ve çıkıştan 2 gün önce embriyonik bağırsak disakkaritler ve kısa peptidleri sindirebilme ve emebilme kapasitesine sahiptir. Fonksiyonel özelliklere sahip olan fırça kenar proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyonlarında oluşan büyük değişiklikler çıkış sonrası karbonhidrat ve proteinden zengin beslenme dönemi için bir çatı hazırlar (Uni 2006).

Tavuk embriyosunda pankreatik enzimlerden karboksipeptidaz ve kimotripsinin spesifik aktiviteleri kuluçkanın 16. gününden itibaren tedricen artar ve çıkıştan sonra 2. günde maksimum düzeye ulaşır. Kuluçkanın 18. gününde tespit edilen pankreatik α-amilaz aktivitesi maksimum düzeye çıkıştan sonra 4. günde ulaşırken (Marchaim ve Kulka 1967), çıkış öncesinde yumurta sarısının sindiriminde aktif olan pankreatik lipaz aktivitesi ise doğrusal olarak artar ve çıkış sonrası 16.

günden sonra sabitlenir (Noy ve Sklan 1998). Besin makromoleküllerinin lüminal sindirimine ilaveten; biyokimyasal sindirimin son safhası, enterositlerin fırça kenarındaki membran enzimleriyle gerçekleştirilir. Bu enzimler disakkaridazlar, peptidaz ve fosfatazlardır (Semenza 1986).

Karbonhidratların sindirimi hem ince bağırsak lümeninde hem de enterositlerin fırça kenarında gerçekleşmektedir. Pankreatik α-amilaz yemle alınan nişastayı oligosakkaritlere ve alfadekstrinlere hidrolize eder. Disakkaritlerin hidrolizi gibi bu ürünlerin son sindirimi de fırça kenardaki disakkaridazlarla gerçekleştirilir (Chotinsky ve ark 2001). Kuluçkadan yeni çıkan civcivler ve hatta çıkıştan önce tavuk embriyoları bir fırça kenar enzimi olan sükraz-izomaltazla (SI) disakkaritleri hidrolize edebilme kapasitesine sahiptirler. Çıkıştan hemen önce hızla artan SI ekspresyonu çıkıştan sonra da artmaya devam eder. Çıkış öncesi ekspresyon ilgi çekicidir, çünkü intestinal enterositler henüz karbonhidratlara maruz kalmamışlardır. Bu durum, memeli ve kanatlılarda SI ekspresyonunun indüklenmesinde rol alan cdx homeobox geni aktivitesine bağlanabilir (Uni 2006). Nitekim, Sklan ve ark (2003) cdxA mRNA ve cdxA protein ekspresyonunun kuluçkanın 15. gününden itibaren çıkışa kadar arttığını bildirmişlerdir.

Glukoz transferazlardan biri de sodyum-glukoz transferaz-1'dir (SGLT1). Gelişmekte olan tavuk embriyosunda, SGLT1 mRNA ekspresyonu kuluçkanın 19. gününden önce gözlenmemekte, bu dönemde ani bir yükselişle en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Çıkış günü azalan ekspresyon düzeyi çıkıştan sonra karbonhidrat alınmasıyla birlikte, 7. güne kadar az miktarda artar. Bu durum, çıkışa yakın dönemde bağırsak lümeninde sodyum iyonu bulunmadığı halde hidrofobik özellikteki yumurta sarısının bulunmasıyla açıklanabilir. Gelişimde SGLT-1'in ekspresyon şekli SI'dan biraz farklıdır. Çıkıştan sonra kısa bir süre içinde ekzojen karbonhidratları asimile etmek zorunda olan civciv, geç embriyonik dönemde hem SI hem de SGLT mRNA eksprese eder. Çıkış sonrası dönemde civcivin ekzojen karbonhidratları sindirebilme kabiliyeti hızla artmakla birlikte, mevcut SGLT1 ile glukoz emilimi sınırlı düzeyde gerçekleşebilmektedir (Sklan ve ark 2003).

Protein sindiriminde önemli rol oynayan fırça kenar enzimi aminopeptidazdır (AP). Bu enzimi kodlayan genler kuluçkanın 15. gününden itibaren çıkışa kadar nispeten yüksek düzeyde (SGLT ve SI genleriyle karşılaştırıldığında) eksprese edilir

(Uni 2006). Uni ve ark (2003a), ilk kez kuluçkanın 17. gününde düşük düzeyde belirledikleri AP mRNA ekspresyonunun 19. günde yükseldiğini, çıkış gününde ise azaldığını bildirmişlerdir. AP aktivitesi kuluçkanın 15. gününden itibaren giderek artmaktadır.

Bağırsaklardan emilimin gerçekleşebilmesi için lümende sodyum iyonu bulunması gereklidir ve bir kez emilen sodyum, iyonik dengenin korunması için enterositten uzaklaştırılır. Sodyum transportu, enterositin bazolateralinde Na^+/K^+ATPaz pompası vasıtasıyla gerçekleşir (Uni 2006). Jejunumda ATPaz'ın mRNA ekspresyonu kuluçkanın 15. gününden itibaren belirlenmiştir. Ondokuzuncu günde büyük bir artış gösteren ATPaz'ın mRNA ekspresyon hızı çıkış günü azalırken ATPaz enzim aktivitesi 15. günden itibaren tedricen artmaktadır (Uni ve ark 2003a).

Fosfataz grubu enzimler, fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Optimum aktivite gösterdikleri pH derecesine göre asit fosfatazlar (ACP'ler) ve alkalen fosfatazlar (ALP'ler) olmak üzere ikiye ayrılırlar. ALP'ler alkali pH'da maksimum aktivite gösteren çok sayıda enzimi kapsamaktadır. ALP'lerin bol bulunduğu doku ve organlar; karaciğer, ince bağırsak, pankreas, kemik, tiroid bezi, plasenta, meme bezi, diş minesi ve tubulus seminiferuslardır (Uzunoğlu 1998). Fırça kenarda lokalize olan intestinal ALP kolesterol, lipid, vitamin D, kalsiyum, aminoasit ve glukoz absorbsiyonu gibi emilim olaylarıyla alakalıdır. Oldukça stabil olan ALP aktivitesi bu özelliği nedeniyle mukoza epiteli yüzey kondisyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Gu ve ark 2002). Yapılan çalışmalar, tavuk embriyosunda bağırsak epitelinin kuluçkanın 8. gününe kadar ALP aktivitesinden yoksun olduğunu ve 9. günden 17. güne kadar duodenumda yavaş yavaş ALP sentezinin başladığını göstermektedir (Moog 1944, 1950).

Genelde kuluçkanın 19. gününde, enterositlerin apikal ve bazolateral yüzlerinde lokalize olan sindirim enzimleri ve transferazların mRNA düzeyleri kuluçkanın 15. ve 17. günlerindeki düzeylerine göre önemli ölçüde artmakta ve gen ekspresyonundaki bu yükselişi çıkış gününde bu enzimlerin biyokimyasal aktivitelerindeki artış izlemektedir (Uni 2006). Kuluçkanın 19. gününde gözlenen enzim ve taşıyıcıların RNA ekspresyonlarındaki büyük artış yeni bir villus serisinin gelişimiyle aynı zamana rastlamaktadır. Villus sayısı ve boyundaki artış RNA

ekspresyonundaki artışa katkıda bulunmakla birlikte, bu artışa başka faktörler de neden olmaktadır. Memelilerde gastrointrestinal kanalın prenatal dönemdeki gelişiminde bazı sistemik ve lüminal faktörlerin de rol aldığı bilinmektedir. Bunlar arasında glukokortikoidler ve amniotik sıvıdaki diğer büyüme faktörleri ile hormonlar enterosit farklılaşması üzerinde önemli etkiye sahiptirler. Benzer şekilde kanatlılarda da amniotik sıvı embriyo tarafından yutulmakta ve amnionla yumurta sarısındaki faktörler bağırsağın gelişimini etkilemektedir (Uni ve ark 2003a). Çıkış sonrası ilk haftanın sonundan itibaren, bağırsağın birim kütlesi başına düşen mukozal enzim aktivitesi villuslardaki enterosit sayısıyla yakından ilişkilidir. Enterositlerde eksprese edilen enzim miktarında yaşla beraber önemli bir değişiklik ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Uni 2006).

1.2.4. Kadeh Hücrelerinin Gelişim ve Fonksiyonu

İntestinal kanal epiteli bir mukus katmanı ile kaplıdır ki, bu katman lüminal içerik ve epitel hücreleri arasında yerleşerek koruma, kayganlaştırma ve transport işlevi gören bir ortam olarak iş görür. Mukus katmanının çoğunluğunu, kadeh hücrelerince sentezlenen ve salgılanan müsin glikoproteinleri oluşturur. Mukus katmanının diğer öğeleri su, çeşitli serum ve selüler makromoleküller, elektrolitler, mikroorganizmalar ve dökülen hücrelerdir (Uni 2006).

Mukus katmanının korunması için müsin üretiminden sorumlu olan kadeh hücreleri kriptlerin bazalindeki pluripotent kök hücrelerden yada oligomukus hücreleri olarak bilinen hücrelerden köken alırlar (Uni 2006). Bu hücreler 2-3 günlük bir süreçle villus ucuna doğru göç ederek buradan lümene dökülürler. Bu nedenle kadeh hücreleri kısa ömürlüdürler ve sürekli yenilenirler (Uni ve ark 2003b).

Müsinler, jel formunda (gel-forming), çözünür (soluble), membrana bağlı (membrane-bound) olmak üzere üç farklı ailede sınıflandırılırlar. Jel formundaki müsinler viskoelastik özellik göstermeleri ve yüksek oranda karbonhidrat içermeleriyle karakterizedirler. Müsin glikoproteinleri; uzunlukları, bileşimleri, dallanma durumları ve peptid omurgasına bağlı oligosakkarit zincirinin sülfatasyon ve asetilasyon derecesindeki farklılıklara bağlı olarak yüksek derecede heterojenite gösterirler (Smirnov ve ark 2004). Asit ve nötral alt tipleri bulunan müsinler aynı zamanda sülfatlı ve non-sülfatlı gruplarıyla ayırt edilirler. Müsin molekülleri kadeh

hücrelerinden salgılanmadan önce membranla çevrili iri granüllerde toplanır ve kadeh hücresinin apikal yüzeyinden ya ekrin sekresyonla veya bileşik ekzositozla salgılanırlar (Forstner ve ark 1995).

Müsin tipi glikoproteinin birçok bakteri türünün agregasyonuna yol açtığı ve patojenik bakterilerin bağırsak epiteline tutunmasını engellediği düşünülmektedir. Bu nedenle mukus katmanı, enfeksiyon ve yangı cevaplarını düzenleyen vücudun doğal savunma mekanizmasının öğelerinden biridir (Allen ve ark 1993). Mukus katmanının, epiteli çeşitli patojenlerden koruma ve besin emilimine katılma yeteneği müsin moleküllerindeki yüklü grupların mevcudiyeti ile alakalıdır. Civcivlerde beslenme üzerinde uygulanan bazı manipülasyonların (örneğin mısıra dayalı diyetle beslenme), ince bağırsağın müsin tipi profilini değiştirdiği belirlenmiştir (Smirnov ve ark 2004). Tavuk ve hindilerde yapılan çalışmalar; besleme koşulları, diyet bileşimi ve mikrobiyal floranın ince bağırsağın müsin dinamiğinin farklı parametrelerini etkilediğini göstermektedir (Smirnov ve ark 2004, 2005).

Müsin genleri sitokinler, bakteriyel ürünler ve büyüme faktörleriyle transkripsiyonel seviyede regüle edilirler. Müsin biyosentezi aynı zamanda; öncü hücrelerin olgun kadeh hücrelerine farklılaşmasını etkileyen, glikozilasyon ile protein sentezi süreçlerini ayıran ve protein sentezini etkileyen aç kalma, kötü beslenme gibi olumsuz koşullarla diğer bazı ajanlardan etkilenmektedir. Mukus katmanı, lüminal içerik ve bağırsağın emilim yüzeyi arasında bir bariyer olduğu gibi mukozal yüzeyi lakzatifler ve safra tuzları gibi ekzojen ve endojen irritanlara karşı korumaktadır. Bu bariyerin özelliklerindeki değişiklikler hem diyetsel ve hem de endojen makromoleküllerle iyonların emilimini etkilemektedir (Smirnov ve ark 2004).

Civciv ince bağırsağında müsin üreten hücrelerin gelişiminin incelendiği bir çalışmada (Uni ve ark 2003b), kuluçkanın 18. gününde sadece asidik müsin içeren kadeh hücreleri belirlenmiştir. Müsin gen ekspresyon analizi, kuluçkanın 17. gününden çıkış sonrası 3. güne kadar sürekli bir ekspresyon artışı olduğunu göstermektedir. Müsin mRNA düzeyindeki bu artış, kuluçkanın son safhasından itibaren çıkış sonrası ilk hafta boyunca meydana gelen kadeh hücresi sayısındaki artışa paraleldir. Western-blot analizi, en düşük müsin miktarının duodenumda olduğunu göstermektedir (Smirnov ve ark 2004).

1.2.5. Enteroendokrin Hücreler

Sindirim sisteminde gastrointestinal (GI) kanalın hemen bütün bölümlerinin mukozası içine dağılmış, değişik peptidler üreten, farklı hücre tiplerinin oluşturduğu entero-endokrin sistem vardır. Bu nedenle mide-bağırsak mukozası, vücudun en büyük endokrin organı olarak kabul edilebilir. Farklı hücrelerin salgıladığı çok sayıdaki enterohormon; mide bağırsak mukozası, karaciğer ve ekzokrin pankreasın sekresyonunu, bağırsak duvarındaki kasların hareketliliğini ve mukozanın kanlanmasını düzenler. Enteroendokrin hücreler sekretin, gastrin, kolesistokinin gibi bazı gerçek peptid hormonları üretirler. Enteoendokrin hücre sistemindeki lokal hormonların çoğu ince bağırsaklardan, özellikle de duodenum mukozasından salgılanırlar. Mide-bağırsak mukozasında değişik tipte enteroendokrin hücreler bulunur. Bu hücreler vücutta bir çok yerde bulunan APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) hücrelerin bir bölümünü oluştururlar. Enteroendokrin hücrelerden başka adren medullasındaki kromaffin hücreler, tiroidde C hücreleri (parafoliküler hücreler), pankreasın tüm endokrin hücreleri, enterokromaffin hücreler (sarı hücreler yani bazal granüllü hücreler), hipofizde adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılayan hücreler, mast hücreleri APUD hücre grubuna aittir (Tanyolaç 1999).

Diffüz nöroendokrin hücre sistemi (DNES) ilk olarak 1938'de Feyrter tarafından tanımlanmıştır. Pearse 1969 yılında, nöroendokrin hücrelerin amin öncüllerini alarak dekarboksile etme özelliklerini tanımlamış ve APUD hücreleri kavramını ortaya atmıştır. Ayrıca aynı araştırıcı bu hücrelerin krista nöralisten köken aldığını ileri sürmüştür. Bu hipoteze bazı araştırıcılar karşı çıkmış ve embriyonik hücre izleme teknikleriyle APUD hücrelerinin endodermal kök hücrelerden köken aldıklarını ileri sürmüşlerdir. Bu hücrelerin embriyonik kökeni günümüzde hala tartışmalıdır. Bugün çoğu araştırıcı, enterokromaffin hücrelerin lokal mukozal kök hücrelerden köken aldığına inanmaktadır (Gustafsson 2005).

Gastrointestinal endokrin hücreler üzerinde yapılan çalışmalar embriyolojide hala önemli bir yer tutmaktadır. Gastrointestinal hormonların yapıldığı anatomik birimler olan gastrointestinal endokrin hücrelerin yoğunluğundaki değişiklikler, bu hormonların üretimdeki değişimi yansıtır (Ku ve ark 2005). Kanser (Scanziani ve ark 1993, Ku ve ark 2005), gastritis (Belaiche ve ark 1993) gibi bazı hastalıklarda

gastrointestinal endokrin hücrelerin dağılım ve sayılarında önemli değişiklikler tespit edilmiş ve ebrotidin (Romero ve ark 1996), omeprazol (Delwaide ve ark 1993) gibi ilaçların uzun süre kullanımlarının bu hücrelerin hiperplazisine yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca Ku ve ark (2004a,b) overyektomize osteoporotik ratlarda enteroendokrin hücrelerde önemli azalmalar meydana geldiğini belirtmişlerdir. Beslenme alışkanlıklarının da gastrointestinal endokrin hücrelerin dağılım ve sıklığında değişime yol açtığı düşünülmektedir.

GI endokrin hücreler iki grupta sınıflandırılmışlardır. Yuvarlaktan küremsi şekle kadar değişen şekle sahip kapalı tip (round to spherical shaped closed type) hücreler midede lokalize olurken, küremsi şekilden iğ şekline kadar değişen şekle sahip açık tip (spherical to spindle shaped open type) hücreler bağırsaklarda lokalize olmaktadır (Ku ve ark 2004a).

Kanatlı sindirim sisteminde varlığı ilk tespit edilen endokrin hücre tipi, granülleri krom tuzlarıyla boyanan enterokromaffin hücrelerdir. Granüllerinin elektron mikroskobik yapıları dikkate alınarak enterokromaffin hücrelerin birçok alt tipi tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla somatostatin, pankreatik polipeptid (PP), polipeptid YY, glukagon, sekretin, vazoaktif intestinal peptide (VIP), gastrin, kolesistokinin, nörotensin, bombesin, substans P, enkefalin, motilin benzeri peptidleri salgılayan hücre tipleri belirlenmiştir. Çoğu hücre bezli midenin antrumunda lokalize olurken, kursak ve ince bağırsakta da çok sayıda endokrin hücre bulunur. Taşlık, sekum ve kolonda ise çok az sayıda endokrin hücre vardır. Bu hücrelerden glukagon, VIP, sekretin, bombesin, nörotensin, ve PP izole edilmiştir. Gastrointestinal endokrin hücreler embriyonik gelişmenin geç döneminde ortaya çıkarlar; nitekim immünohistokimya veya elektron mikroskopide kuluçkanın 16. gününden önce çok az sayıdaki tipi tanımlanabilmektedir **(**Rawdon 1984**).**

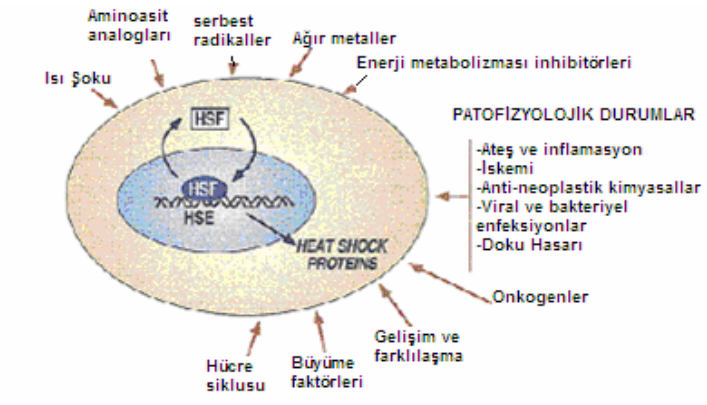
Gümüş tuzları, histoloji ve histopatolojide çeşitli hücre tiplerinin ve doku komponentlerinin, kalsiyum depoları ve ağır metallerin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nükleolar organizer bölgelerin (NOR) ve mitotik figürlerin belirlenmesinde de gümüşleme teknikleri kullanılmaktadır. Sindirim olaylarında önemli roller üstlenen ve gastrointestinal kanalın tümünde yaygın olarak bulunan endokrin hücrelerin belirlenmesinde de klasik gümüşleme yöntemlerinin çok

elverişli olduğu bildirilmektedir (Grimelius 2004). Bu hücrelerden amin içerenlerin saptanmasında argentaffin, polipeptid içerenlerin belirlenmesinde ise argirofil boyama yöntemlerinin uygun olacağı ileri sürülmektedir. Bu histokimyasal özellikler ile salgılama periyotları ve buna bağlı olarak granüler içerikleri esas alınmak suretiyle argenatffin ve argirofil hücrelerin DNES içinde farklı iki APUD hücre olduğu ya da bir APUD hücrenin argentaffin ve argirofil faz olarak değerlendirilen iki dönem geçirdiği ileri sürülmektedir. Çınar (1994), argentaffin (+) reaksiyon gösteren hücrelerin aynı zamanda argyrophil reaksiyonu da pozitif olarak göstermesinin bu hücrelerin farklı tipte hücreler olmayıp amin ve peptid içeriklerine bağlı olarak argentaffin ve argirofil dönem geçirdiklerini bildirmiştir.

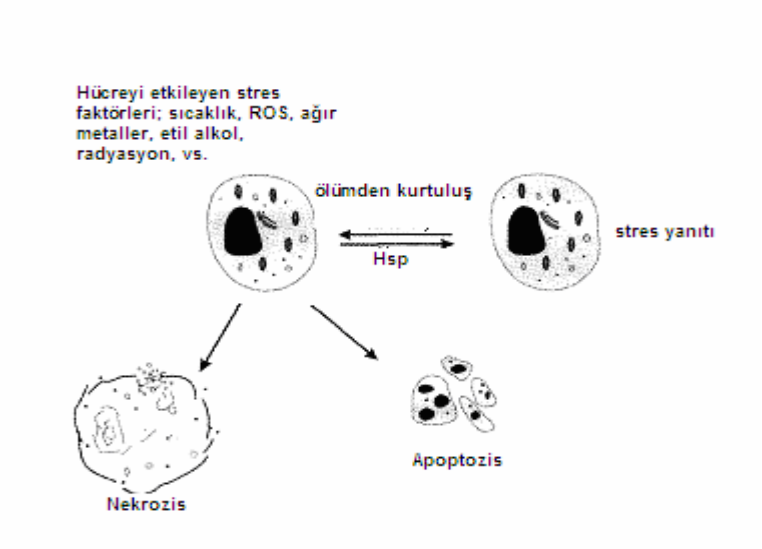
Argentaffin reaksiyon tek aşamalı bir prosedürdür. Söz konusu hücredeki proteinler gümüş solüsyonundaki gümüş iyonlarını tutar ve bu iyonları metalik gümüşe indirgerler. Argirofil reaksiyon ise iki aşamada gerçekleşir. Öncelikle gümüş solüsyonuna muamele edilen kesitlerin daha sonra eksternal bir indirgeyici solüsyona muamele edilmesi gerekir (Grimelius 2004).

1.3. Strese Hücresel Yanıt

Hücre, stresin yol açtığı hasara karşı iki şekilde yanıt verir; 1. inflamasyona yol açmadan hasarlı hücrelerin uzaklaştırılabilmesi için apoptozis yoluyla ölüme gider, 2. yaşamını sürdürebilmek için apoptozisten kurtulmasını kolaylaştıran ya da hasarı önleyen ısı şoku yanıtı, yani stres yanıtıyla karşılık verir (Şekil 1.1 ve 1.2). Bir hücrenin bu iki yoldan birine yönlenmesinin o hücrenin kaderini belirlemesi yanında stresin biyolojik sonuçları üzerinde de önemli etkileri vardır (Beere 2004).



Şekil 1.1. Isı şoku yanıtını tetikleyen koşullar (Morimoto 1998).



Şekil 1.2. Stres faktörlerinin hücre üzerindeki etkileri. Düşük şiddetteki stres, ısı şoku proteinlerinin hızla indüksiyonunu sağlayarak stres yanıtını aktive eder ve Hsp artışıyla, termotolerans yanında ölüme direnç gelişir. Stres ortadan kalktığında ise hücre normal aktivitelerine geri dönebilir. Stres şiddetlenirse, hasarlı hücre apoptozis mekanizmasını aktive ederek ölüme gider. Bununla birlikte, çok ani ve aşırı derecede strese maruz kalan bir hücrede, apoptotik mekanizma ortadan kalkar ve hücre nekroza uğrar (Samali ve Orrenius 1998).

1.3.1. Apoptozis

Hücre ölümü; apoptozis, nekrozis veya nekrobiyozis yollarından biriyle gerçekleşir. Nekrozis, hücrenin ani ve aşırı derecede travma yada hasara maruz kalmasıyla gerçekleşen akut hücre ölümüdür. Bu olay, hücrenin sitosole iyon giriş çıkış kontrolünü hızla kaybettiği pasif ve yıkıcı bir süreçtir. Bu durumda hücreye giren fazla miktardaki su, hücre ve organellerin aşırı şişmesine neden olur ki, bu durum enerji gerektirmeyen bir süreç sonunda sitolizle sonlanır. Ölen hücre içeriğinin ekstraselüler alana sızması, lezyonlu bölgeye öncü inflamator hücrelerin infiltrasyonu ve sonuçta inflamasyona neden olur. Bu durum daha sonra doku hasarı veya komşu hücrelerin ölümüyle bile sonuçlanabilir. Apoptozis ise, hücrenin kendi ölümünü gerçekleştirmek için sistematik olarak inaktive olduğu, yapısal ve fonksiyonel komponentlerini veziküllere ayırdığı doğal bir süreçtir (Hasslett 1992).

Çizelge 1.1. Apoptozis ve nekrozisin karşılaştırılması (Wyllie ve Duvall 1992, Güçer ve Tınaztepe 2001).

Histolojik bulgular	Apoptozis	Nekroz
Hücre	Tek tek hücre ölümü, apoptotik cisimcikler şekillenir.	Hücre şişmesi, toplu hücre ölümü gerçekleşir.
Organeller	Sağlamdır.	Hasarlıdır.
Mitokondriyonlar	Şişme, sitokrom-C sızması gerçekleşir.	ATP'den yoksun, şişmiş, parçalanmıştır.
Hücre zarı	Sağlam, yüzeyde krater manzarası, veziküller şekillenir.	Yapısal bozulma, seçici geçirgenlik kontrolü kaybı olur.
Nükleus	Kromatin parçalanmış birimler halinde yada şapka biçiminde yoğunlaşmış, nükleolus dağılmıştır.	Kromatin, normal dağılımını kaybetmiştir ve kalın kromatin iplikleri halinde olup; nekrozun piknoz, karyoreksis, karyoliz aşamalarından biri görülür.
Yol açan nedenler	ATP noksanlığına yol açmayan fizyolojik ve patolojik durumlardır.	ATP noksanlığına yol açan anoksi, açlık, fiziksel ve kimyasal travmalardır.
Doku etkileri	Yangı yoktur, oluşan veziküler yapılar komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir, doku yapısında kollaps meydana gelmeksizin hızlı bir involüsyon gerçekleşir.	Yangı vardır, ortamda dejenere hücre kalıntıları bulunur ve bunlar fagositler tarafından alınır. Yaygın bir doku yıkımı vardır.

Apoptozis, multiselüler organizmaların embriyonik gelişiminde ve involüsyon evresi geçiren organlarda genetik olarak düzenlenen veya istenmeyen ya da enfekte hücrelerin selektif olarak ortadan kaldırılması sırasında normal olarak gerçekleşir (Wyllie ve Duvall 1992). Apoptozis, doku ve organı oluşturan hücrelerin yaşam siklusu boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinde hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık $5x10^{11}$ kan hücresi apoptozis yolu ile yok olmaktadır. Bağırsak epitel hücrelerinin sürekli biçimde yenilenmesi, memenin kuruya girişte involüsyonunda alveol epitel hücrelerinin ölümü ve menstruasyon sırasında uterusun endometriyal hücrelerinin ölerek uzaklaşması apoptozisle gerçekleşir. Virüsle enfekte hücreler ve DNA'sı hasarlı hücreler de bu yolla ortadan kaldırılır. Zira DNA'da meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabileceklerinden, hasarlı hücrelerin apoptozisle ölüme sürüklenmesi kanser gelişiminin engellenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Apoptozis, embriyonik gelişim esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun ortadan kalkmasını sağlar. Memelilerde ise, parmaklar arası perdelerin ortadan kalkması ve sinir sisteminin gelişimi sırasında üretilen nöronların %50'sinden fazlasının ölümü apoptozisle gerçekleşir (Erdoğan ve Uzaslan 2003). Ayrıca; ısı

şoku, radyasyon, hipoksi, etanol ve ağır metallere maruz kalma gibi stres durumlarına yanıtta apoptotik program aktive olabilir (Allan ve Harmon 1986, Dyson ve ark 1986, Ohyama ve ark 1986, Lennon ve ark 1991).

Apoptozis; kesin karar, uygulama ve temizleme olmak üzere üç safhaya ayrılabilir. Karar safhasında hücre geri dönüşü olmayan letal apoptotik uyarıyı alır. Uygulama safhasında; kromatin kondenzasyonu, sitoplazma büzülmesi, hücre zarında tomurcukların şekillenmesi, DNA fragmantasyonu ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesi gibi hücre içindeki hızlı değişiklikleri kapsar. Bu değişiklikler farklı enzimlerin (proteaz, lipaz ve nükleaz) aktivasyonunun sonucudur. Son olarak, temizleme safhasında apoptotik cisimcikler özel makrofajlar (tingible body macrophages, TBM) veya komşu hücreler tarafından fagosite edilir (Samali ve Orrenius 1998).

Apoptozis nükleus, sitoplazma ve hücre membranındaki morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir. Apoptozisin en özgün yönü, hücre DNA'sının inter nükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 kilobaz çifti (kbp) veya bunların katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elekroforezinde merdiven görüntüsünün (DNA laddering, ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu görünüm hücre tipine bağlı olarak değişebilir yada sadece 50 kbp uzunluğunda bir DNA fragmantasyonu da görülebilir. DNA'nın internükleozomal bölgelerde oluşan kırılmalar sonucu fragmanlara ayrılması apoptozis için karasteristik olmasına rağmen, bütün hücre tiplerinde görülmez (Wyllie ve Duvall 1992, Eastman 1993, Schwartz ve Osborne 1993, Binder ve Hiddemann 1994, Bosman ve ark 1996, Ulukaya 2003). İnternükleozamal bölgelerde kırılmaların oluşması, Ca^{+2} ve Mg^{+2} tarafından aktive edilen spesifik endonükleazlar tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler nötral pH'da aktivite gösterirler. Zn^{+2} iyonları ise bu enzimlerin aktive olmasını engeller. DNA parçalanması nekrozun geç safhalarında da belirlenebilir ancak oluşan parçalar gelişigüzel boyutlardadır ve jel elektroforezinde merdiven görüntüsüne yol açmazlar (Binder ve Hiddemann 1994). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzüne dönük yerleşimli fosfotidilserin'in, apoptozisin erken evresinde membranın dış yüzüne bakacak tarzda yer değiştirmesidir (phosphatidylserine translocation). Bu değişim apoptotik hücrelerin

komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmalarını sağlar (Abastado 1996, Ulukaya 2003).

Apoptozis ve nekrozis arasındaki temel fark, meydana gelen hücre ölümünün sonucunda yatmaktadır. Apoptotik hücreler içeriklerini asla ekstraselüler alana sızdırmazlar ve fagosite edilmeden önce genetik içeriklerini yıkımlarlar. Bütün bu olaylar virüsle enfekte hücreler ve aktive olmuş zararlı granüller içeren sitotoksik T lenfositlerin ortadan kaldırılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu bakımdan apoptozisin hücre ölümünün temiz bir yolu olduğu ifade edilmektedir (Abastado 1996).

Apoptozis Modülatörleri

Apoptozis çok sayıdaki ve farklı mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramidler), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun tipine göre farlılık gösterebilirler (Ulukaya 2003).

Kalsiyum İyonu: Apoptotik süreç boyunca hücre çekirdeğine (karyolenf) sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz, proteaz ve doku transglutaminazlarının aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol oynarlar. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir (Ulukaya 2003).

Bcl-2 Gen Ailesi: Bcl-2 gen ailesinde birbirine zıt etkileri olan iki ayrı grup gen bulunmaktadır. Bulardan biri proapoptotik yani apoptozisi indükleyici etkiye sahipken, diğeri antiapoptotik yani apoptozisi engelleyici etkilidir. Proapoptotik grupta Bax, Bid, Bad, Bcl-Xs, Bik, Bim, Blk, BNIP3, Hrk ve Nip3 genleri bulunurken, antiapoptotik grupta Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, A1/Bfl1, Boo/Diva, NR-13, Nrf3 ve Mcl-1 genleri bulunmaktadır (Erdoğan ve Uzaslan 2003, Ulukaya 2003, Fan ve ark 2005). Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşamını sürdürebilmesi bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bax sitosolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondriyon membranına bağlanır. Mitokondriyal membranda por oluşumunu başlatarak, membranın selektif iyon permeabilitesinin

kaybına yol açar. Sonuç olarak, sitokrom-C ve apoptozis-indükleyici faktörün (AIF) mitokondriyondan sitosole çıkmasını sağlar. Bcl-2, özellikle mitokondriyon dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir (Ulukaya 2003). Radyasyon, Bcl-2 üretimini artırarak memeli hücrelerinde apoptozisi bloke eder ve kanser gelişimine neden olabilir (Erdoğan ve Uzaslan 2003).

Kaspazlar: Son yıllarda proteolizin apoptoziste anahtar süreç olduğu ortaya çıkarılmış ve en önemlileri kaspazlar olmak üzere birkaç proteaz ailesinin apoptozisle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kaspaz aktivitesi apoptozisin erken bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler Caenorhabditis elegans nematodunun CED-3 ölüm proteazının homologudurlar ve aktif merkezlerinde sistein bulunur. İlk tanımlanan memeli kaspazı interlökin-1β dönüştürücü enzimdir (interleukin-1β converting enzyme, caspase-1, ICE) ve bugüne kadar memeli hücrelerinde, çoğu apoptoziste rol alan 14 adet kaspaz tanımlanmıştır. Bu kaspazlar amino asit dizilimlerindeki benzerliğe dayandırılarak üç alt grupta sınıflandırılırlar (Çizelge 1.2) (Fan ve ark 2005).

Çizelge 1. 2. Kaspaz ailesinin alt grup üyeleri (Fan ve ark 2005).

Alt Grup	İşlev	Üye
I	Aktivatör (Başlatıcı kaspazlar)	Kaspaz 2 Kaspaz 8 Kaspaz 9 Kaspaz 10
II	Cellat (Efektör kaspazlar)	Kaspaz 3 Kaspaz 6 Kaspaz 7
III	İnflamatuvar medyatörler	Kaspaz 1 Kaspaz 4 Kaspaz 5 Kaspaz 11 Kaspaz 12 Kaspaz 13 Kaspaz 14

Bu enzimler sitoplazmada zimojen granüller (pro-kaspazlar) halinde bulunurlar ve aktivasyonları sonucu aktif holoenzimlerin oluşması spesifik aspartik asit residülerinde iki adımlı bir parçalanmayı gerektirir (Samali ve Orrenius 1998). Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) yol açarlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini

efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri [örneğin, hücre iskeleti proteinlerinden aktin veya fodrin, nükleer membran proteini olan lamin-A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimerazı (PARP)] parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ulukaya 2003).

Seramidler: Bu molekül ailesi, Fas-Ligand ve TNFα'nın tetiklediği ve apoptoziste gerekli bir adım olduğu ortaya çıkan membrana bağlı asit sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plazma membranı hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. Seramidlerin yapımı SAPK (Stress-activiated protein kinase) kaskad yolağıyla c-Jun aktivasyonuna yol açar (Rudin ve Thompson 1997, Ulukaya 2003).

P53: Büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı veya onkogen ekspresyonu gibi hücresel stresler p53 proteininin stabilizasyonunu bozarak aktivasyonuna yol açarlar. Bu olay, hücrenin durumuna bağlı olarak iki şekilde sonuçlanabilir. Hücre siklusu G1 fazında durdurulur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırılır veya hücre apoptozise sürüklenir (Schuler ve Green 2001). Bu iki hücresel yanıt arasından seçim, hücre ve stresin tipi, p53 kofaktörlerinin etkisi gibi birçok faktör tarafından etkilenir. P53'ün apoptozisi indüklemesi, ölüm reseptörleri yolunun kaspaz kaskadını tetiklemesi veya Bax'ın ekspresyonunu artırması sonucunda Bcl-2/Bax oranının değişmesi yoluyla gerçekleşir (Haupt ve ark 2003).

Sitokrom-C: Bu enzim, mitokondriyon iç membranında bulunan elektron transport zincirinde yer alan bir proteindir. Sitokrom-C'nin mitokondriyondan sitoplazmaya sızması, apoptozis yoluna giren bir hücrenin geri dönüşümsüz bir döneme girdiğini işaret eder (Ulukaya 2003).

Perforin ve Granzim: Sitotoksik T-lenfositler (CTL) ve doğal katil (NK) hücreler, hedef hücrelerde apoptozisi iki farklı mekanizmayla tetikleyebilirler. Bu mekanizmalardan biri, efektör hücrenin yüzeyindeki Fas Ligand (FasL) ile hedef hücrenin membranındaki Fas arasındaki etkileşimdir. Diğer mekanizmada ise, apoptozis perforinler ve granzimler vasıtasıyla tetiklenir. Perforinler ve granzimler normalde CTL ve NK hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. Perforin hedef hücrenin membranında porlar oluşturan sitotoksik bir proteindir. Granzim ise apoptozise yol açan biyokimyasal olayları tetikleyen bir serin proteazdır. CTL'lerin

hedef hücreye bağlanmasını takiben salgılanan perforinler hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforinlerle birlikte salgılanan granzimler de bu porlar aracılığıyla hücreye girerek hücre içi Ca^{+2} düzeyini hızla artırırlar. Hücre içinde prokaspaz-8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da virüsle enfekte hücreyi (veya kanser hücresini) apoptozise götürür (Ulukaya 2003, Miyazaki ve ark 2004).

Apoptozisin Tetiklenmesi

Bu olay, hücre içi ve hücre dışından gelen sinyallerle gerçekleşir.

Hücre içinden tetiklenen apoptotik yol: Mitokodriyon bağımlı bu yol daha çok hücresel stresle (mor ötesi ışınlar, sitoksik ilaç vb) aktive olur. Bu stres faktörleri mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek sitosole sitokrom-C sızmasına neden olurlar. Sitokrom-C, sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanarak onu aktive eder, ardından ATP'nin de yapıya katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9'a dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder (Barišić ve ark 2003, Ulukaya 2003, Beere 2004). Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'a bağlanan kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondenzasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna neden olur (Ulukaya 2003). Mitokondriyondan sitokrom-C ile birlikte AIF ve Smac (Second mitochondria derived activator of caspase, DIABLO) molekülleri sitoplazmaya salınır. AIF direkt olarak nükleusa geçer ve kaspazlara bağımlı olmaksızın nükleer değişiklikleri tetikler. Smac ise IAP' ların (Inhibitory apoptotic proteins) inhibitör aktivitelerini etkisizleştirerek apoptozisi aktive eder (Garrido ve ark 2001).

Hücre dışından tetiklenen apoptotik yol: Bu yol, sitokinlerden FasL veya bir Tümör Nekrozan Faktör (TNF) ligandının hedef hücredeki reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenir. Sitokinler protein yapısında moleküller olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını

kontrol ederler. Bu moleküller, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılır. Önemli bir apoptotik faktör olan FasL, TNF ailesinin bir üyesidir ve CTL ve NK hücre zarlarında bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü olan Fas'a bağlandığında apoptozisi tetikler. Diğer TNF ligandları da, reseptörleri olan TNFR-1 ve TNFR-2'ye bağlandıklarında apoptozisi aktive ederler. TNFR-1, pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken: TNFR-2, timositlerde TNF bağımlı sinyalden sorumludur. TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitli homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından, "ölüm bölgeleri" yani FADD (Fas associated death domain, Fas bağımlı ölüm bölgesi) ve TRADD (TNFR-1 associated death domain, TNFR-1 bağımlı ölüm bölgesi) olarak adlandırılır. Aktive olan apoptotik sinyal FADD'a bağlanan kaspaz-8'e iletilir. Kaspaz-8'in aktive olması ile birlikte, diğer proteinazlar kaskad halinde sırayla aktive olarak ölüm sinyalini nükleusa kadar iletirler ve sonuçta kromozomal DNA'nın yıkımına neden olurlar. FADD ölüm sinyalinin iletiminde medyatör olarak rol alırken, TRADD'nin tek başına iletimi sağlayamadığı tespit edilmiştir. TNF, TNFR-1'e bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iki ayrı yol üzerinden iletilir. Birinci yolda, TRADD ölüm sinyalini kaspaz-8'e FADD üzerinden iletirken; İkinci yolda ise TRDD, RIP (reseptör interacting protein) denilen ayrı bir protein üzerinden ölüm sinyalini iletir. Her iki apoptotik yolun sonunda da kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir (Erdoğan ve Uzaslan 2003).

Isı şoku, oksidatif stres, mor ötesi ışınlar (UV) ve iyonize radyasyon gibi stres faktörleri c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 gibi stresle aktive olan protein kinazların (stress-activated kinases, SAPKs) aktivasyonunu tetiklerler. JNK da stres koşullarına yanıtta apoptozise yol açan sinyal yolunun önemli bir öğesidir (Gabai ve ark 1997).

1.3.2. Isı Şoku Proteinleri (Hsp'ler)

Isı Şoku Proteinleri (Hsp'ler); 1962 yılında Ferruccio Ritossa ve arkadaşları tarafından yüksek sıcaklığa maruz bıraktıkları Drosophila melanogaster larvasında tükrük bezlerinin politen kromozomlarında şişkinlikler ve gen ekspresyonunda olağan dışı profilin gözlenmesiyle keşfedilmiştir. Bu proteinler bütün canlı organizma hücreleri tarafından, örneğin yüksek sıcaklık (Lindquist ve Craig 1988,

Lee ve ark 1991), oksidatif stres (Liao ve ark 1994) miyokardiyal iskemi (Benjamin ve Williams 1994, Mestril ve Dillmann 1995) gibi olumsuz çevresel koşullara maruz kalındığında sentezlenen hücre koruyucu (sitoprotektif) proteinlerdir (Kiang ve Tsokos 1998, Kregel 2002, Pockley 2003, Kim ve ark 2006).

Hsp'ler diğer hücre proteinlerine bağlanmak suretiyle hücre içi transporta yardımcı olarak ve proteinlerin uygun ikincil yapıları oluşturmak üzere katlanmalarını sağlayarak agregasyonlarını önleyen sitoprotektif şaperonlar olarak etkinlik gösterirler (Yahav ve ark 1997, Kregel 2002, Pockley 2003). Hsp'lerin sitoprotektif fonksiyonları özetlenirse; 1) farklı intraselüler kompartmanlarda proteinlerin katlanmaları, 2) yapısal proteinlerin korunması, 3) hatalı katlanan proteinlerin yeniden katlanması, 4) proteinlerin çeşitli selüler kompartmanlar ve membranlardan translokasyonu, 5) protein agregasyonlarının önlenmesi ve 6) kararsız proteinlerin yıkımı olarak sayılabilir (Kregel 2002).

Hsp süper ailesi moleküler ağırlıklarına göre sınıflanan (Çizelge 1.3) Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ve Hsp47 gibi farklı büyüklükteki iri molekül gruplarıyla, molekül ağırlıkları 16-40 kDa arasındaki küçük Hsp'leri içerir (Jaattela ve Wissing 1992, Arrigo ve Landry 1994). Bu süper aileye ait molekül grupları, diğerlerinden daha önemli roller üstlendiği kabul edilen Hsp90 ailesi de dahil olmak üzere farklı roller üstlenirler. Hsp90 steroid hormon reseptörlerine bağlanabildiğinden bu hormonların aktivitelerini de regüle eder (Joab ve ark 1984). Bu nedenle Hsp90, hücre siklusu ve immün yanıtta önemli roller oynar (Galea-Lauri ve ark 1996). Bununla birlikte, bu proteinin ısı stresindeki rolü hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Lei ve ark 2009).

Çizelge 1.3. Hsp ailesi üyeleri (Kırkali 2004).

Aile	Üyeler	Hücre lokalizasyonu	İşlevi
Küçük Hsp	Ubiquitin	Sitosol/nükleus	Nonlizozomal protein degredasyonu.
	Hsp10	Mitokondriyon	Hsp60 koşaperonu.
	αβ-kristalin	Sitosol	Sitoiskelet stabilizsyonu.
	Hsp27	Sitosol/nükleus	Mikrofilament stabilizasyonu, antiapoptotik.
	Hsp32	Sitosol	Katabolizan.
Hsp40	Hsp40	Sitosol/nükleus	Hsp70 koşaperonu.
Hsp60	Hsp60	Mitokondriyon	Proteinlerin tekrar katlanmaları, denatüre proteinlerin agregasyonlarının önlenmesi.
Hsp70	Hsp72 (Hsp70)	Sitosol/nükleus	Yüksek stresle indüklenir.
	Hsp73 (Hsc70)	Sitosol/nükleus	Yapısal olarak eksprese olur.
	Grp75	Mitokondriyon	Mitokondriyon membranından öncül proteinlerin translokasyonu.
Hsp90	Grp78	ER	Salgılanan proteinlerin birleşmesini sağlar.
	Hsp90α	Sitosol	Steroid hormon reseptör fonksiyonu vardır.
	Hsp90β	Sitosol	Steroid hormon reseptör fonksiyonu vardır.
	Grp94	ER	Kalsiyum bağlayıcı şaperon.
Hsp100	Hsp100	Sitosol/nükleus	Proteoliz, termotolerans kolaylaştırıcı, agregat çözücüdür.

Hsp'lerin hepsi de hücrelerde aynı lokalizasyona sahip değildir ve her ne kadar bazıları çekirdekte de bulunursa da çoğu hücre sitoplazmasında (sitosol, mitokondriyon, endoplazmik retikulum) dağılmış haldedir (Craig ve ark 1994). Hsp90-steroid hormon kompleksinin, steroidlerin DNA'ya bağlanmasını engellediği düşünülürse, bu bulgu Hsp90'nın steroid hormonların aktivitesinin regüle ettiği görüşünü desteklemektedir. Bilindiği gibi steroid hormonlar organizmanın hasardan korunmasında önemli rol oynadıklarından, protein hasarına yol açan ısı şoku, ağır metal toksisitesi ve hücresel ortamdaki ani değişiklik gibi aşırı durumlarda bu hormonlara daha fazla ihtiyaç duyulur (Welch 1992, Hendrick ve Hartl 1993, Sanders 1993, Craig ve ark 1994). Normal şartlarda Hsp'lerin ekspresyonu daha düşüktür (Lei ve ark 2009). Stresle karşılaşıldığında, özellikle beyin ve testislerdeki, takiben de karaciğer, akciğer ve dalaktaki Hsp90 ekspresyonu artmaktadır. Böbrek ve kalpteki ekspresyonu ise nispeten düşüktür (Roy 1986, Fu ve ark 2004). Isı stresine yanıt çok kısa sürede ortaya çıkar. Nitekim, broilerlerde Hsp90 ekspresyonu,

ısı stresinin 2. saatinde kalp, karaciğer ve böbrekte dalgalı bir seyirle artmaya başlar, 3-5. saatte hafifçe düşer, 10 saat sonra tekrar yükselir (Lei ve ark 2009). Artış, stresin şiddeti ve maruz kalınan süreyle bağıntılıdır. İlk baştaki aşırı Hsp90 artışı, toleransı güçlendirir ve hayatta kalma gücünü artırır. Fakat uzun süreli ve aşırı stres, gelişecek olan lezyona bağlı olarak Hsp'lerin ekspresyonunu azaltır (Fu ve ark 2004). Normal sıcaklığın 3-5°C üzerindeki ortam sıcaklıklarında bir stres yanıtı olarak Hsp sentezinde bir hızlanma ortaya çıkar (Locke ve Noble 1995). Çoğu organizmada, örneğin drozofilada stres proteinleri, ısı stresine maruz kalındıktan sonraki ilk 15 dakika içinde sentezlenen proteinlerin çoğunluğunu oluştururlar (Lindquist ve Petersen 1990).

Hsp sentezinin termotolerans gelişimiyle aynı zamanda gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu durum, yüksek sıcaklığa maruz kalan hücrelerin aşırı şartlara uyumuna işaret eder. Bu bağlamda, düşük derecedeki ısı şoku uygulaması hücreleri sonradan ortaya çıkan ölümcül olabilecek sıcaklılığın etkilerine dayanmak üzere koşullandırır. Bu fenomen, ağır metaller, oksidatif stres, radyasyon, nitrik oksit, araşidonik asit ve alkol gibi strese yol açan çok sayıda ajana karşı hücrenin genel bir korunma stratejisi olarak kabul edilmektedir (Landry ve ark 1982, Li ve Werb 1982).

Strese cevapta Hsp'lerin indüksiyonu ve sonrasında gelişen termotolerans geçicidir. Stres unsuru ortadan kaldırıldığında, bu hücreler normal fonksiyonlarına devam ederler ve Hsp'lerin seviyesi zamanla yeniden bazal seviyelere düşer. Ara dönem boyunca, Hsp seviyesi yüksek olduğundan, hücreler çeşitli ajanların toksisitelerine dayanıklıdır. Ayrıca, bir veya daha fazla Hsp'nin sürekli aşırı ekspresyonu hücreleri çok sayıda ajanın toksisitesine karşı dirençli hale getirebilir (Landry ve ark 1989, Li ve ark 1991).

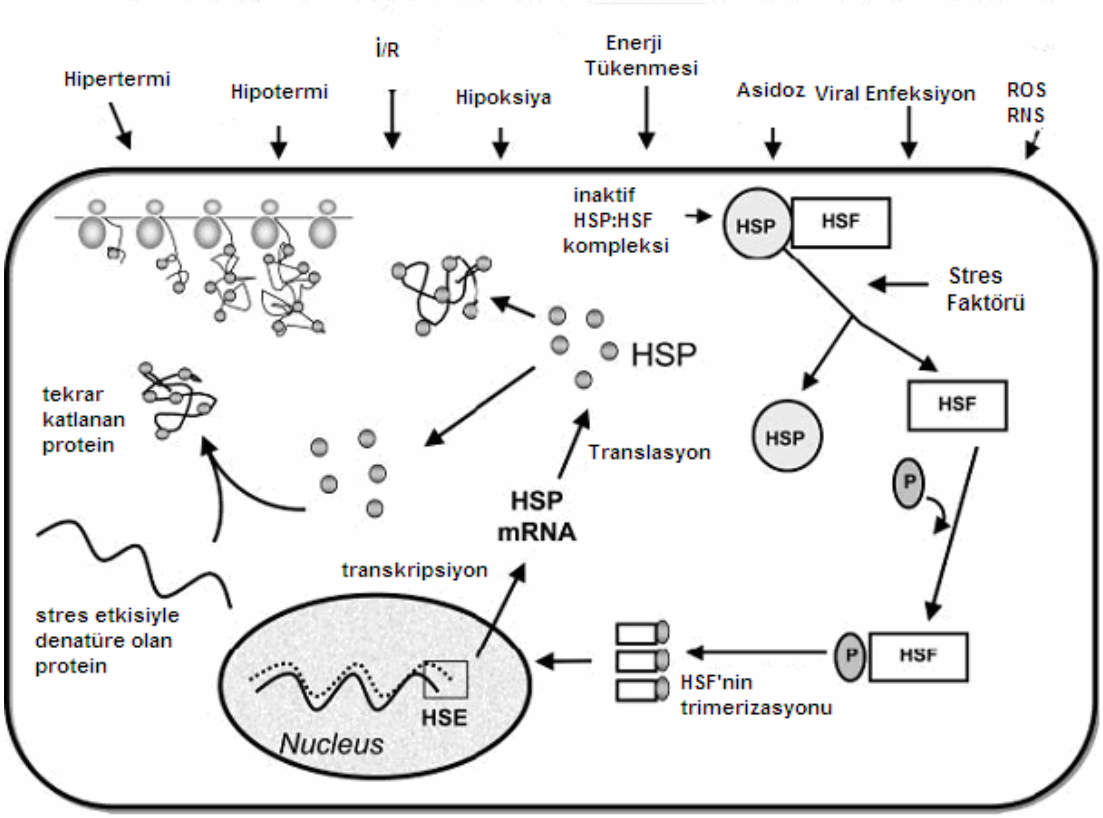
Isıya en duyarlı ısı şoku proteini olan Hsp70, farklı ökaryotik türlerin hücreleri arasında %60-80 benzerlik gösterir. Hsp70 grubunda hepside birkaç kısaltmaya sahip olan en az dört farklı protein (Hsp72, Hsp73, Hsp75 ve Hsp78) vardır (Kregel 2002).

Hsp 70 grubu proteinler ortak protein dizisini paylaşmakla birlikte, her biri farklı uyarımlara yanıt olarak sentezlenirler. Örneğin, 73 kDa ağırlığındaki protein (HSP73 veya Hsc70) sürekli olarak üretilir, halbuki 72 kDa ağırlığındaki proteinin

(HSP72 veya Hsp70) sentezi stres durumlarına yanıtta artar (Kregel 2002). Hipertermi, iskemi-reperfüzyon, oksidatif stres ve toksik bileşiklere maruz kalma gibi çeşitli patolojik koşullarda, hücre ve dokuların hasara karşı korunmasında rol oynadığı bilinen endojen faktörlerden biri olan Hsp70 söz konusu koşullarda denature olan polipeptidlerin yeniden katlanmasında moleküler şaperon olarak iş görür (Rokutan 2000).

Omurgalı Hsp genlerinin transkripsiyonunun indüklenmesine, çevresel stres ve Hsp'ler arasındaki moleküler linkler olarak işlev gören ısı şoku faktörleri (heat shock factors, HSFs) ailesi aracılık eder. Hsp'lerin yapımına neden olan bütün koşul ve ajanlar bunu HSF yoluyla gerçekleştirirler (Morimoto ve ark 1997). HSF'ler Hsp'lere bağlı olarak sitosolde inaktif halde bulunurlar. Fizyolojik uyarımlar (stres faktörleri) HSF'leri aktive ederek Hsp'lerden ayrılmalarına neden olur. HSF'ler protein kinazlarla fosforile edildiğinde sitosolde trimerler şekillenir. Bu HSF-trimer kompleksleri nükleusa girerek Hsp70 geninin promoter bölgesinde ısı şoku elementlerine (heat shock elements, HSEs) bağlanırlar. Hsp70 mRNA'sı, transkripsiyondan sonra nükleer porlardan geçerek Hsp70 sentezini gerçekleştirmek üzere sitosole geçer. Sentezlenen Hsp'ler moleküler şaperonlar olarak yeni sentezlenen proteinlerin katlanmaları ve sitosolde taşınmasına, hasarlı olanların (örneğin stresle denature olan proteinler) tamirleri ve yeniden katlanmalarına yardımcı olurlar (Şekil 1.3) (Kiang ve Tsokos 1998, Kregel 2002).

Omurgalı hayvanlar ve bitkiler HSF gen ailesinin en azından 4 üyesine sahipken, Saccharomyces cerevisiase, Caenorhabditis elegans ve Drosophila'da tek bir HSF ekspresyonu vardır. İnsan hücrelerinde ise üç HSF (HSF1, HSF2 ve HSF4) tanımlanmıştır. HSF1 stresin tetiklediği ekspresyonda esas rolü oynarken, HSF2 embriyonik gelişimin spesifik safhalarında aktive olur. HSF4 dokuya spesifik tarzda ekspresse edilmektedir ve HSF4'ün izoformlarından en az biri stresin tetiklediği gen ekspresyonunun bir inhibitörü olarak iş görür. Bugüne kadar sadece kanatlı hücrelerinde tanımlanan HSF3, ısı şoku yanıtını aktive eden stres koşullarında HSF1 ile birlikte aktive olur (Jolly ve Morimoto 2000).



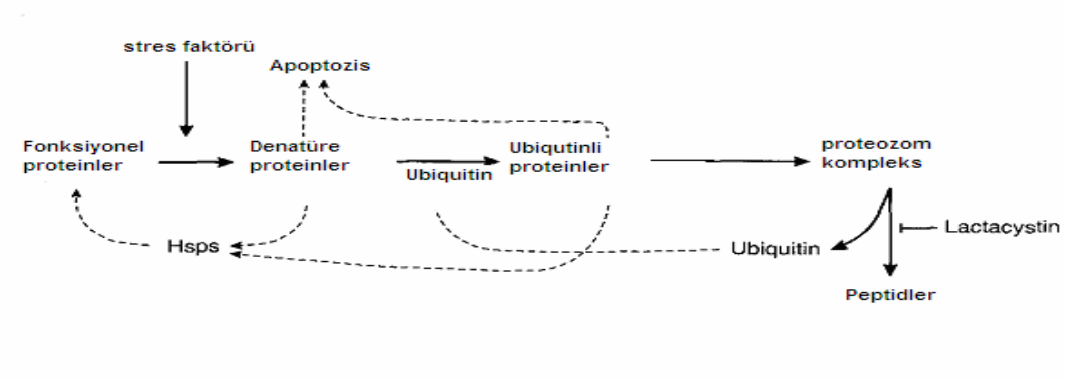
Şekil 1.3. Hsp70 sentezinin indüklenebilir formunu aktive eden bazı fizyolojik sinyaller ve hücre içinde artan Hsp70 ekspresyonu ile ilgili mekanizma. İ/R: İskemi-Reperfüzyon, ROS: Reaktif oksijen türleri, RNS: Reaktif nitrojen türleri (Kregel 2002).

1.3.3. Termotolerans ve Apoptozis İndüksiyonunda Ortak Sinyaller

Günümüzde apoptozis ve Hsp'lerin indüksiyonuna yol açan reaksiyon yollarının birbiriyle bağlantılı olduğu ve bu iki yol arasındaki dengenin strese maruz kalan hücrenin kaderini belirlediği ileri sürülmektedir. Isı şoku yanıtını tetikleyen ısı şoku ve diğer stres faktörleri aynı zamanda kısmen stresin yoğunluğu ve süresine bağlı olarak apoptozis veya nekroza da yol açabilmektedirler. Bununla birlikte, ısı şoku yanıtı Hsp'lerin ekspresyonuyla stresin tetiklediği apoptozise karşı hücreleri korumaktadır (Jolly ve Morimoto 2000).

Hsp akümülasyonu beyin (Pearigen ve ark 1996) ve kalp dokusunda (Richard ve ark 1996) iskemik hasar gibi hücre ve doku hasarlarının bir belirteci olarak uzun süredir kullanılmakta ise de bu durum, Hsp'lerin antiapoptotik özelikleriyle çelişmektedir. Ancak görünen bu çelişki, sadece ölen hücreleri değil, aynı zamanda Hsp'lerin indüklendiği dirençli hücreleri içeren böyle dokularda hücrelerin ve yanıtlarının heterojenitesiyle açıklanabilir. Aynı durum, koruyucu stres yanıtına neden olan ve apoptozisi başlatan sinyaller arasında bir örtüşme olduğunun da bir

kanıtıdır (Samali ve Orrenius 1998). Bu sinyallerden biri, hücre içinde hasarlı proteinlerin birikimi olabilir. Hsp yapımını başlatan hasarlı proteinler aynı zamanda apoptozisi indükleyebilirler. Önceki çalışmalarda (Ananthan ve ark 1986), denature proteinlerin Xenopus oositlerine mikroenjeksiyonunun Hsp sentezini stimüle ettiği gösterilmiştir ki, bu sonuç, denature proteinlerin birikiminin Hsp yapımı ve stres yanıtının indüksiyonu için bir sinyal görevi yaptığını göstermektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Protein denaturasyonu, hem stres yanıtında ve hem de apoptozisde aktive olabilen genel bir sinyaldir. Stres koşulları altında denature olan fonksiyonel proteinler Hsp'leri indükleyebilirler. Hsp'lerin koruyucu fonksiyonu bu proteinlerin tekrar katlanmalarını veya ubiquitin/proteozom aracılığıyla parçalanmalarını kolaylaştırır. Bununla birlikte, ya stresin direk bir sonucu olarak veya proteozomal fonksiyonun inhibisyonuyla hasarlı veya ubiquitinli proteinlerin akümülasyonu apoptotik reaksiyon zincirinin aktivasyonuna yol açabilir (Samali ve Orrenius 1998).

Termotolerans ve apoptozisin indüksiyonu için başka bir sinyal de ROS üretimidir. Nitekim, birçok apoptozis indükleyicisinin aynı zamanda ROS üretimine yol açtığı (Sandstrom ve ark 1994, Gorman ve ark 1997) ve ROS'un Hsp'leri indüklediği (Marini ve ark 1996) gösterilmiştir. Hem Hsp indüksiyonu ve hem de apoptotik reaksiyon zinciriyle alakalı başka bir sinyal molekül ailesi ise seramidlerdir. Seramid düzeyindeki artış hücrelerin, hepsi de Hsp'leri indükleyebilen ve apoptozisi başlatabilen ısı, radyasyon, TNF ve peroksid gibi ajanlara maruz bırakılmasından sonra gözlenmektedir. Ayrıca ortama ekzojen seramid ilavesi apoptozise neden olmaktadır (Obeid ve ark 1993). Küçük moleküler ağırlıklı Hsp'lerin bir üyesi olan αβ-kristallin, seramidlere yanıt olarak hızla indüklenir. Bu nedenle ROS gibi seramidlerin de her iki yanıtın indüksiyonunda ortak bir sinyal olabileceği ileri sürülmüştür (Chang ve ark 1995).

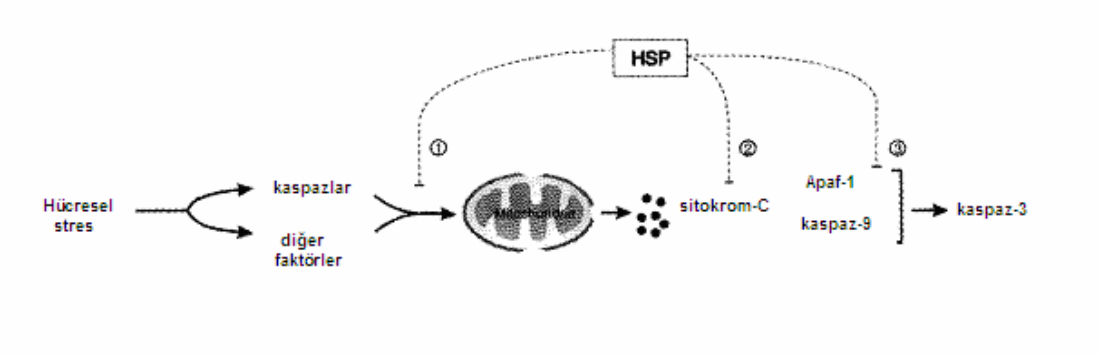
Hem termotolerans ve hem de apoptoziste rol alan çok sayıda sinyal bilinmesine karşın, sinyallerin neden olduğu sonuçlar, aynı doku veya hücre popülasyonundaki hücreler arasında dahi farklılık göstermektedir. Bu nedenle,

heterojen bir hücre popülasyonunda bazı hücrelerin aynı uyarana Hsp indüksiyonu ve termotolerans ile yanıt verirken, bazılarının apoptozis veya nekroza uğraması şaşırtıcı değildir. Bu durum, bazı çalışmalarda doku ve primer hücre kültürlerinde hem apoptotik hücrelerin hem de Hsp'lerin akümülasyonunun bulunmasını açıklayabilir (Manev ve ark 1994).

1.3.4. Apoptozisin Regülasyonunda Isı Şoku Proteinlerinin Rolü

Günümüzde ısı şoku proteinlerinin bazılarının özellikle Hsp70 ve Hsp27'nin bazı apoptotik reaksiyon yollarını inhibe edebildiği bilinmektedir. Mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, ileri sürülen çeşitli hipotezler bulunmaktadır (Rokutan 2000). Hsp indüksiyonu için bir sinyal olan denature proteinlerin akümülasyonu, aynı zamanda apoptotik programın başlatıcısıdır. Hatalı katlanan proteinlerin ısı şoku proteinleriyle yeniden katlanarak doğal yapılarının kazandırılması yada ubiquitin-proteozoma bağlı proteolizleri sonucunda apoptozise giden bu reaksiyon yolu baskılanmış olur (Jolly ve Morimoto 2000, Rokutan 2000). Hsp'ler hem hücre içi (intrinsic) hem de hücre dışı (extrinsic) tetiklenen yollara müdahale ederek apoptozisi inhibe edebilmektedirler. Hsp27 sitokrom-C'ye, Hsp70 ve Hsp90 ise Apaf-I'e bağlanarak apoptozom oluşumunu engellemektedirler (Beere ve ark 2000, Garrido ve ark 2001). Ayrıca Hsp'ler proapoptotik Bcl2 proteinlerinin aktivasyonunu inhibe ederek mitokonriyonun dış membran permeabilizasyonunu ve sonuçta sitokrom-C, AIF gibi apoptogenik faktörlerin sitosole çıkmasını önlerler (Beere 2004). Klein ve Brüne (2002), makrofajlarda Hsp70'in mitokondiyondan sitokrom-C sızmasını engelleyerek nitrik oksit tarafından tetiklenen apoptozisi inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Hsp27, Daxx apoptotik yolunu inhibe ederken, Hsp70 JNK1'e bağlanarak JNK aktivasyonunu inhibe etmektedir (Garrido ve ark 2001). Yüksek ısı ya da diğer stres faktörlerine maruz kalma, JNK aktivasyonuyla apoptozisi tetikleyen sinyal transdüksiyon yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu durumda Hsp70'in koruyucu etkisi direk apoptotik programı engellemesiyle ortaya çıkmaktadır. Nitekim Gabai ve ark (1997), insan lösemi hücre hattında yüksek Hsp72 (indüklenen Hsp70) düzeyinin, JNK'nın stresle indüklenen aktivitesini önleyerek apoptozise yol açan sinyal transdüksiyon yolunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 1.5. Hsp'lerin antiapoptotik etkileri:1-mitokondriyondan sitokrom-C salınımını indükleyebilen faktörlerin etkilerini bloke edebilirler. 2-Sitosole salınan holo-sitokrom-C inaktive edilmesi gereken anormal bir protein olarak tanınabilir ve Hsp'ler sitokrom C'ye bağlanarak sitokrom -C'nin Apaf-1'e bağlanmasını inhibe edebilirler. 3-Hsp'ler sitokrom-C'ye bağlandıktan sonra Apaf-1'in uygun katlanmasını inhibe edebilir, böylece bu komplekse prokaspaz-9'un bağlanması engellenir (Samali ve Orrenius 1998).

Hsp'lerin apoptozisi inhibe etmesiyle ilişkili başka bir mekanizma da moleküler yapılarından kaynaklanmaktadır. Hsp70 ve Hsp90 ailelerinin bütün ökaryotik üyeleri bir C-terminal Glu-Glu-Val-Asp (EEVD) dizisi içerir. Bu dizi kaspazların karakteristik bölünme motifleri olan Trp-X-X-Asp (WXXD), Asp-Glu-X-Asp (DEXD) ve X-Glu-X-Asp (XEXD)'ye benzer (X herhangibir aminoasiti ifade etmektedir). Bu nedenle bu diziler aktif kaspazlar için yalancı-substrat olarak etki edebilirler (Rokutan 2000). Hsp27 ve Hsp70 ısı şoku protein süper ailesinin antiapoptotik üyeleriyken, Hsp60 ve Hsp10 proapatotik üyeleridir. Hsp60 ve Hsp10 kaspaz-3'ün proteolitik aktivitesini destekleyerek apoptotik sürece ivme kazandırmaktadır (Garrido ve ark 2001).

Hsp'lerin apoptozisteki etki mekanizmalarının anlaşılması, apoptozisle bağıntılı hastalıkların tedavisinde yeni metotlar sunabilir. Birçok Hsp, özellikle Hsp70 kanser, otoimmün ve immün yetmezlik hastalıklarında ve nörodejeneratif bozukluklarda tedavi amaçlı kullanılabilir (Li ve ark 2000).

Bu çalışmada kuluçka döneminde deneysel olarak oluşturulan yüksek kuluçka sıcaklığının (38,8^{o}C) broylerlerde embriyonik ölüm oranı ve embriyo gelişimi üzerindeki etkileri ile ince bağırsağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçların, kuluçka sektöründe yüksek kuluçka sıcaklığına bağlı problemlerin çözümüne katkı sağlaması yanında, kanatlı embriyosunun prenatal dönemdeki olumsuz etkilerin araştırılması çalışmalarında

kullanılabilecek mükemmel bir test materyali olması nedeniyle memelilerde prenatal stresin etkilerinin araştırılması üzerinde daha sonra yapılacak olan çalışmalara da önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan materyal ve uygulanan yöntemler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu (SUVEK) tarafından 31.08.2006 tarihli ve 2006/070 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

2.1. Gereç

2.1.1. Kuluçkalık Yumurtalar

Çalışmada, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolü yapılan Ross 308 ırkı broyler damızlıklara ait 250 adet ve Hybro ırkı etçi damızlıklara ait 250 adet olmak üzere toplam 500 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Işıklı kutuda muayene edilen yumurtalardan normal poroziteye sahip olanlar çalışmaya dahil edildi. Kuluçka makinesine yerleştirilmeden önce yumurtalar kapalı bir kabinde, (21g potasyum permanganat + 42ml formaldehit)/m^3 karışımıyla elde edilen buharda 15 dakika dezenfekte edildi. Makineye yerleştirilmeden önce ve kuluçka sırasında açılmadan önce yumurtalar hassas dijital terazide (Kern EW220-3NM) tartılarak sonuçlar kaydedildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Kuluçka İşlemi

Her iki ırka ait kontrol grubu yumurtalar kuluçka müddetince broyler yumurtaları için optimum sıcaklık olan 37.8^{o}C'deki makine iç ortamında tutuldu. Isı stresi grubunda 10. güne kadar 37.8^{o}C'de inkübe edilen yumurtalar 10. günden sonra sıcaklık artırılarak 38.8^{o}C'de kuluçka işlemine tabi tutuldu. Her iki grupta da makine içi ortamın nispi nemi %65'te tutuldu ve yumurtalar her 2 saatte bir kez 90^{o} çevrildi. Yumurtalar, kuluçkanın 18. gününde makinenin çıkış bölümüne transfer edildi. Kuluçka işlemleri Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuarında bulunan kuluçka makinesinde (VGS, 108 Kap) gerçekleştirildi.

2.2.2. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması

Bu amaçla kuluçkanın 11., 13., 15., 18., 20. ve 21. günlerinde her gruptan 10 adet canlı embriyo elde edilinceye kadar rasgele yumurta seçildi ve seçilen bu yumurtalar tartıldıktan sonra küt uçlarından açıldı. Ekstraembriyonik keselerinden ayrılan ölü ve canlı embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre belirlendi. Elde edilen canlı embriyolar ve bunların vitellüs keseleri ayrı ayrı hassas terazide tartıldı. Yumurta ağırlıkları, embriyo ağırlıkları ve vitellüs kesesi ağırlıkları verilerinden yararlanılarak her dönem için nispi embriyo ağırlığı [(embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı) X 100)] ile nispi vitellüs kesesi ağırlığı [(vitellüs kesesi ağırlığı/yumurta ağırlığı) X 100)] hesaplandı. Her embriyonun ince bağırsağının duodenum, jejunum ve ileum bölümlerinden mikroskobik incelemeler için doku örneği alındı. Klasik histolojik incelemelerin yapılacağı, nöroendokrin hücrelerin boyanacağı ve immünohistokimyasal analizde kullanılacak doku örnekleri fosfat tamponlu formal-salinde (0.1M PBS, pH: 7.4), alkalen fosfataz demonstrasyonu gerçekleştirilecek doku örnekleri formal-kalsiyumda tespit edildi. Sükraz-izomaltaz enziminin demonstrasyonunda kullanılacak doku örnekleriyse, kullanılıncaya kadar -20^{o}C'de dondurularak saklandı.

2.2.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

Tamponlu formal-salinde tespit edilen doku örnekleri rutin histolojik yöntemler uygulanarak; yıkama, dehidrasyon ve parlatmayı takiben parafinde bloklandı. Her bağırsak bölgesinden hazırlanan bloklardan 6 μm kalınlığında ve her boyama yöntemi için alınan 5'er kesit aşağıdaki boyama yöntemlerinden biriyle boyandı;

1. Genel histolojik yapının belirlenmesi ve villusların histomorfometrik analizlerinin (villus yüksekliği, villus genişliği, villus alanı) yapılması için kesitler Crossmon'un üçlü boyasıyla (Culling ve ark 1985) boyandı. Her hayvandan alınan duodenum, jejunum ve ileum örneklerinden hazırlanan preparatlarda, embriyonik gelişimin birinci aşamasındaki 5 adet villusun boyu, genişliği ve alanı belirlendi.

2. Kadeh hücrelerinin belirlenmesi için kesitler Periodic-Acid Schiff (PAS) (Bancroft ve ark 1994) ve Alcian Blue (AB) (pH 2,5) (Bancroft ve ark 1994)

boyama yöntemleriyle boyandı. PAS yöntemiyle boyanan kesitlerde nötral müsin salgılayan kadeh hücreleri demonstre edildi. Bu amaçla, deparafinizasyon ve rehidrasyonu takiben kesitler %0,5'lik periodik asit'te 15 dakika inkübe edildikten sonra distile suyla yıkandı ve 30 dakika Schiff solüsyonunda inkübe edildi. Distile suyla yıkanan kesitlere %1'lik methyl-green ile 5 dakika çekirdek boyası uygulandı.

Asit müsin salgılayan kadeh hücrelerinin belirlenmesi amacıyla kesitler AB (pH 2,5) ile boyandı**.** Bu amaçla, kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyonu takiben 3 dakika %3'lük asetik asitte bekletildi ve takiben AB solüsyonunda (%3'lük asetik asit içinde hazırlanan %1'lik AB, pH 2,5) 30 dakika süreyle inkübe edildi. Distile suyla yıkanan kesitlere 5 dakika nüklear fast red çekirdek boyası uygulandı. Her iki yöntemle boyanan kesitler distile suda yıkandıktan sonra alkol serisinden geçirilerek dehidre edildi ve ksilen serisinden geçirilerek sentetik resin (Entellan, Merck) kullanılarak lamelle kapatıldı. Mikroskobik incelemede, her preparatta 10 villusun 100 µm uzunluğundaki epitel katmanında bulunan PAS(+) ve AB(+) kadeh hücresi sayısı belirlenerek, ortalama kadeh hücresi yoğunluğu bulundu ve sonuçlar hücre sayısı/birim epitel uzunluğu (100 µm) olarak ifade edildi.

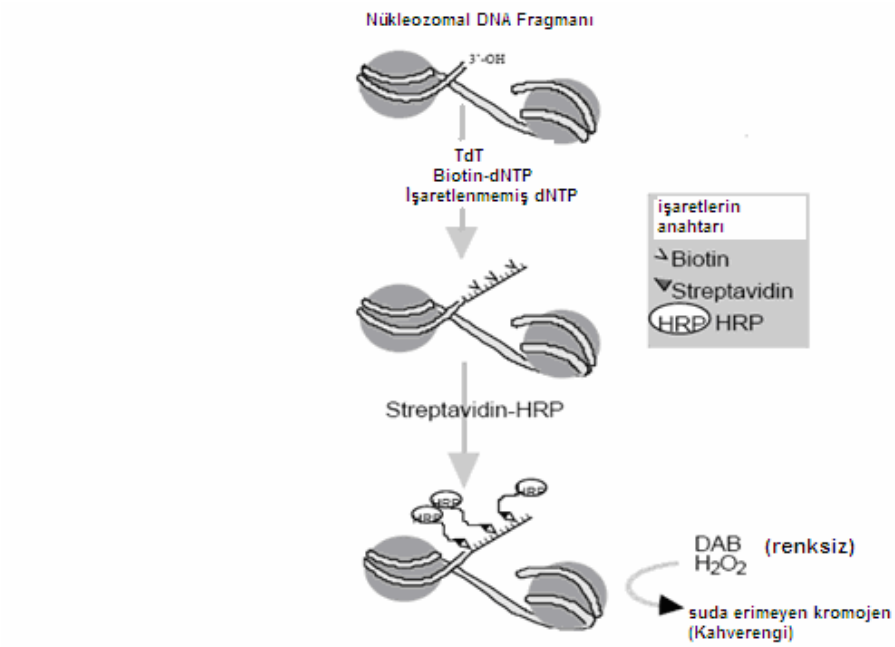
3. Enteroendokrin hücrelerin belirlenmesinde Masson-Fontana Argentaffin (Bancroft ve ark 1994) ve Grimelius'un Argirofil (Bancroft ve ark 1994) gümüşleme yöntemleri uygulandı.

Argentaffin hücrelerin boyanmasında kullanılan inkübasyon solüsyonunun hazırlanmasında yararlanılan stok solüsyonu, önceden hazırlanan %10'luk gümüş nitrat solüsyonuna konsantre amonyum hidroksit damlatılarak oluşan ilk çökelti çözülüp solüsyon tekrar berraklaşıncaya kadar konsantre amonyum hidroksit damlatılarak hazırlandı. Distile suyla 1:4 oranında sulandırılan stok solüsyonu inkübasyon solüsyonu olarak kullanıldı. Deparafinizasyonu takiben rehidre edilen kesitler, hazırlanan inkübasyon solüsyonunda 60 ^{o}C'lik etüvde karanlıkta 1 saat tutuldu. Süre sonunda distile suyla yıkanan kesitler 1 dakika %1'lik sodyum tiyosülfat solüsyonunda bekletildi.

Argirofil hücrelerin demonstrasyonu amacıyla 10 ml asetat tamponu (pH: 6), 87 ml distile su ve 3 ml %1'lik gümüş nitrattan oluşan inkübasyon solüsyonu hazırlandı. İndirgeyici solüsyon ise 100 ml distile su içerisinde 1g hidrokinon ve 5 g

sodyum sülfit eritilerek hazırlandı. Deparafinize ve rehidre edilen kesitler 60°C'lik etüvde, karanlıkta 3 saat süreyle inkübasyon solüsyonunda tutuldu. İnkübasyon sonunda kesitler, 58°C'deki indirgeyici solüsyonda 1 dakika bekletildi. Her iki yöntemle boyanan kesitler 3 kez distile suyla yıkandıktan sonra 5'er dakika nüklear fast red çekirdek boyası uygulandı. Distile suyla yıkanan kesitler alkol serisinden geçirilerek dehidre edildikten sonra ksilen serisinden geçirilerek sentetik resin yardımıyla lamelle kapatıldı.

4. Apoptotik hücreler, i*n situ* DNA fragmantasyonunu belirleyen TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) metoduyla boyandı (Ohyama ve ark 1997). Bu amaçla Calbiochem TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (QIA33) kullanıldı. Boyamalarda firmanın önerilerine sıkı bir şekilde uyuldu (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Apoptotik hücre boyama kitinin çalışma prensibi (User Protocol QIA33 Rev. 28 November 2005 RFH 1-12).

Kısaca, poli-L-lizin kaplı lamlara alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyonu takiben 1:100 oranında sulandırılan proteinaz K ile muamele edilerek hücre zarı permeabilizasyonu gerçekleştirildi. Tris-HCL tamponunda (pH: 7.6) yıkanan kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için kesitler, %3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika inkübe edildi. Tekrar

Tris-HCL tamponunda 3 kez çalkalanan kesitler TdT labelling solüsyonunda (TdT enzyme, labeled and unlabeled deoxynucleotides) 37^{o}C'de 1.5 saat inkübe edildi. Takiben, Tris-HCL tamponunda tekrar 3 kez yıkanan kesitler 1:50 oranında sulandırılan peroksidaz-streptavidin konjugatında oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra Tris-HCL tamponunda yıkanan kesitler, kromojen olarak kullanılan DAB (3,3' Diaminobenzidine) solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Methyl-green solüsyonuyla çekirdek boyası uygulanan kesitler alkol ve ksilenden geçirilerek sentetik resinle kapatıldı.

Kontrol preparatları kitle birlikte gelen, apoptozisi indüklemek için 0,5 µg/ml aktinomisin D ile inkübe edilmiş HL60 hücreleri ve indüklenmemiş HL60 hücrelerinin karışımını içeren preparatların boyanmasıyla hazırlandı.

5. Hücre siklusunun proliferasyon evresindeki hücrelere özgü PCNA (proliferating cell nuclear antigen, Uni ve ark 2000) ve ısı şoku proteinlerinden HSP70 immünohistokimyasal yöntemle belirlendi (Čvoro ve ark 2004). İmmünohistokimyasal işlemler için alınan doku örneklerinin boyanması streptavidin-biotin-peroksidaz kompleksi (sABC) esasına dayanan prosedürle gerçekleştirildi. Bu amaçla poli-L-lizin kaplı lamlara alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37^{o}C'lik etüvde bekletilerek kurutuldu. Takiben, kesitler deparafinize ve rehidre edildi. Antijenik epitopların açığa çıkarılması (antijen retrieval) için sitrat tampon solüsyonunda (1 M, pH 6) mikrodalga fırınında 5 dakika, kontrollü bir şekilde kaynatıldı. Bu aşamadan sonra, Mayer's hematoksileniyle çekirdek boyaması aşamasına kadarki işlemlerin tamamı nemli kutu içinde gerçekleştirilerek, işlem boyunca kesitlerin kurumasının önüne geçildi. Yıkamalar fosfat tamponlu salinle (PBS, 0.1M, pH:7.4) yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika bekletilen kesitler, normal keçi serumuyla 5 dakika inkübe edilerek nonspesifik bağlanma bölgeleri bloke edildi. Kesitler daha sonra, oda sıcaklığında 1 saat süreyle primer antikorlarla (HSP70 için GeneTex, anti-chicken HSP70 primer antikoru, GTX25439 1:1000 sulandırma; PCNA için GeneTex, anti-chicken PCNA GTX71945 1:100 sulandırma), takiben de biotinli keçi polivalan antikoruyla (antijen spesifitesi: fare, tavşan, rat, kobay) yarım saat süreyle inkübe edildi. Yıkanan kesitler streptavidin-peroksidazla oda sıcaklığında yarım saat süreyle inkübe edildi. Kromojen olarak DAB

kullanıldığından, kesitlere bu amaçla hazırlanan solüsyondan, kesitleri tamamen kaplayacak şekilde damlatılarak 5 dakika beklendi. Yıkanan kesitler, çekirdek boyaması için Mayer's hematoksileniyle 3 dakika boyandı. Alkol ve ksilen serilerinden geçirilen kesitler sentetik resin (Entellan, Merc) kullanılarak lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunohistokimyasal boyama esnasında kesitlerden birine primer antikor yerine sadece PBS solüsyonu damlatılarak negatif kontrol preparatı hazırlandı.

HSP pozitivitesi, boyanan hücre sayısı ve boyanan hücrelerdeki boyanmanın yoğunluğuna bağlı olarak semikantitatif skorlama yöntemiyle değerlendirildi (0: negatif, 1: zayıf pozitivite, 2: orta dereceli pozitivite, 3: güçlü pozitivite, 4: çok güçlü pozitivite) (Kim ve ark 2006).

2.2.4. Enzim Histokimyasal Boyamalar

Enterositlerin fonksiyonel olgunlaşmasının bir göstergesi olan intestinal alkalen fosfataz (iALP) demonstrasyonu tek aşamalı renk reaksiyonu (simultaneous azo-coupling) metoduyla gerçekleştirildi (Lojda ve ark 1979). Formal-kalsiyumda 24 saat süreyle tespit edilen doku örnekleri +4^{o}C'deki Holt solüsyonuna aktarıldı ve bu solüsyonda 22 saat bekletildi. Bu doku örneklerinden kriyostatta (Slee London) alınan 12 μm kalınlığındaki kesitler, önceden formol-jelatin ile muamele edilen lamlara çekilerek oda sıcaklığında (20^{o}C) 30 dakika süreyle kurutuldu. İçinde, 25 mg Naphtol ASBI fosfat (N-2125, Sigma) çözdürülmüş olan 10ml N,N-Dimethylformamid, 10 ml distile suyla karıştırılarak, karışımın pH'sı 8'e ayarlandı. Bu karışıma 300 ml distile su ve 180 ml 0,2M Tris-HCl tamponu (pH 8,3) ilave edilerek Naphtol ASBI stok solüsyonu hazırlandı. İnkübasyon solüsyonu ise, 10 ml Naphtol ASBI stok solüsyonunda 10 mg Fast Red TR (F-8764, Sigma) çözdürülerek elde edildi. Süzülen inkübasyon solüsyonu içerisinde doku kesitleri, oda sıcaklığında 45 dakika süreyle kontrollü bir şekilde bekletildiler. Villusların fırça kenarında enzim reaksiyonuna özgü, tipik kırmızı renkte ALP aktivitesinin ortaya çıkmasıyla inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası yapıldı. Kontrol preparatları demonstrasyondan önce kesitlerin 3 dakika süreyle kaynar suda tutulmasıyla hazırlandı.

Sükraz-izomaltaz enziminin demonstrasyonu, -20°C'de dondurularak saklanan doku örneklerinden alınan 12 μm kalınlığındaki kryostat kesitlerinde gerçekleştirildi. Bu enzimin demonstrasyonununda, tek aşamalı renk reaksiyonu (simultaneous azo-coupling) metodu uygulandı (Gossrau 1976). Bu amaçla, 10 ml sitrik asit-fosfat tamponuna 0,5 ml N,N-Dimetilformamid içinde çözdürülen 12 mg 2-Naphthyl-α-D-glucopyranoside (Glycosynth) ve 0,8 ml hexazonium-pararosaniline ilave edilerek son pH'sı 6 olan inkübasyon solüsyonu hazırlandı. Süzülen inkübasyon solüsyonu, lamlara kesitleri kaplayacak şekilde damlatılarak 37^{o}C'de 20 dakika kontrollü bir şekilde inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda distile suyla yıkanan kesitlere %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı. Kontrol preparatları, demonstrasyondan önce kesitlerin 3 dakika süreyle kaynar suda bekletilmesiyle hazırlandı.

2.2.5. Değerlendirme ve İstatistiki Analizler

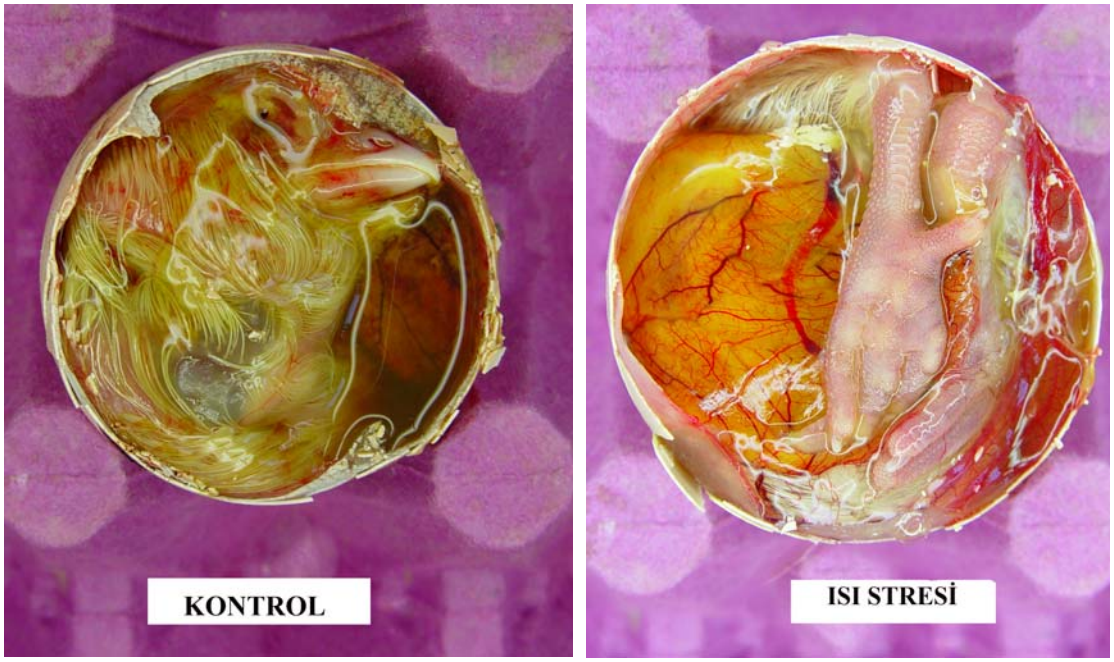
Hazırlanan preparatlar dijital kameralı ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse, E-400 equipped with Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) incelendi ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Görüntüler, dijital görüntü analiz programıyla (BS200 PRO, 2005) analiz edilerek incelenen parametrelerin sayısal verileri elde edildi.

Embriyonik mortalite verileri ki-kare testiyle analiz edilirken; rölatif embriyo ağırlıkları ve vitellüs kesesi ağırlıklarıyla, ince bağırsak dokusundan elde edilen sayısal veriler SPSS 10 programı yardımıyla One-Way Anova testi ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. Hsp70 immunoreaktivitesinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve bu analiz sonucu gruplar arası farkın önemli olduğu durumda Mann-Whitney U testiyle grup grup karşılaştırma yapıldı. $p<0.05$ değeri önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Embriyonik Ölüm Oranları ve Makroskopik Bulgular

Embriyonik ölüm oranlarının belirlenmesinde embriyo gelişimi gözlenen yumurta sayıları esas alınmıştır. Grupların mortalite verileri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi ısı stresine maruz bırakılan Hybro ırkının mortalitesi Ross 308 ırkından yüksektir. Her iki ırk birlikte ele alındığında ise ısı stresine maruz kalan hayvanlarda mortalite, kontrol grubununkinden önemli derecede ($P<0,05$) yüksek bulunmuştur. Stres grubunda gözlenen embriyonik ölümlerin geç embriyonik dönemde, özellikle HH skalasına göre 46. evrede yoğunlaştığı (kabuk altı ölümleri) dikkati çekti. Ölü embriyolarda yapısal kusur ve gelişme geriliği gözlenmedi. Ancak gaganın hava kamarasının tersi yöne yönelmesine sıklıkla rastlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kuluçkanın 21. gününde kontrol ve ısı stresi grubuna ait embriyolar görülmektedir. Yumurtalar küt uçlarından açılmıştır. Kontrol grubunda embriyonun başı hava kamarasının bulunduğu geniş uca dönükken, ısı stresi grubunda ise sivri uca dönüktür.

Yumurtalar açılmadan önce yumurta kabuk sıcaklığı dijital termometreyle (DX 6603, Brightlink International, China) ölçüldü ve kontrol grubunda ortalama 39,04°C, ısı stresi grubunda ise ortalama 40,44°C olarak belirlendi.

Çizelge 3.1. Grupların yumurta sayıları, infertil yumurta sayıları, infertilite hariç mortaliteleri (%).

Irk	Gruplar	Toplam Yumurta Sayısı	İnfertil Yumurta Sayısı	İnfertilite Hariç Mortalite (%)
Hybro	**Kontrol**	125	6	1,7[c]
	Isı stresi	125	5	25[a]
Ross 308	**Kontrol**	125	5	2,5[c]
	Isı stresi	125	4	13,2[b]

[a,b,c] Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama mortaliteler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Grupların ortalama rölatif embriyo ağırlıklarının [(embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı) X 100] kuluçka günlerine göre dağılımı Çizelge 3.2'de, ortalama rölatif vitellüs kesesi ağırlıklarının [(vitellüs kesesi ağırlığı/yumurta ağırlığı) X100] kuluçka günlerine göre dağılımı ise Çizelge 3.3'de verilmiştir. Her iki ırkta da ısı stresi grubundaki embriyoların rölatif embriyo ağırlıkları kontrol grubuna kıyasla önemli derecede (P<0,05) daha düşüktü. Bununla birlikte, çizelgede de görüldüğü gibi ısı stresi grubundaki vitellüs kesesi ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla önemli oranda (P<0,05) daha yüksek olduğu belirlendi.

Kontrol ve ısı stresi gruplarının ortalama civciv çıkış ağırlıkları Çizelge 3.4'de verilmiştir. Her iki ırkın ısı stresi gruplarının ortalama civciv çıkış ağırlıkları kontrol gruplarından daha fazla olmakla birlikte, sadece Ross 308 ırkında farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu (P<0,05) dikkati çekmiştir.

Çizelge 3.2. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (%).

Irk	Gruplar n=10	KULUÇKA DÖNEMLERİ				
		11. GÜN X±SE	13.GÜN X±SE	15. GÜN X±SE	18. GÜN X±SE	20. GÜN X±SE
Hybro	**Kontrol**	9,12±0,151[a]	18,02±0,397[a]	30,61±0,881[a]	52,77±0,807[a]	71,10±0,614[a]
	Isı stresi	7,10±0,178[c]	16,17±0,326[b]	27,32±0,333[b]	46,73±0,889[b]	61,40±0,736[c]
Ross 308	**Kontrol**	9,04±0,199[a]	17,87±0,294[a]	29,78±0,727[a]	52,69±1,541[a]	67,99±0,314[b]
	Isı stresi	8,02±0,156[b]	16,76±0,433[b]	28,94±0,689[ab]	46,39±1,181[b]	60,42±0,693[c]

[a,b,c] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Çizelge 3.3. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif vitellüs kesesi ağırlıkları (%).

Irk	Gruplar n=10	KULUÇKA DÖNEMLERİ				
		11. GÜN X±SE	13.GÜN X±SE	15. GÜN X±SE	18. GÜN X±SE	20. GÜN X±SE
Hybro	**Kontrol**	33,56±0,438[b]	28,20±0,591[b]	22,89±0,707[b]	17,74±0,655[b]	12,82±1,098[b]
	Isı stresi	35,37±0,698[a]	30,11±0,831[a]	26,69±0,649[a]	24,25±0,548[a]	20,36±0,709[a]
Ross 308	**Kontrol**	33,43±0,326[b]	28,92±0,537[b]	23,37±0,639[b]	18,25±0,577[b]	13,28±0,529[b]
	Isı stresi	35,80±0,887[a]	30,99±0,564[a]	26,43±0,654[a]	24,46±0,370[a]	19,90±0,394[a]

[a,b,] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Çizelge 3.4. Çıkış gününde tespit edilen ortalama civciv çıkış ağırlıkları (g).

Irk	Gruplar n=10	Civciv ağırlığı X±SE
Hybro	**Kontrol**	41,82±1,261[b]
	Isı stresi	43,60±1,001[b]
Ross 308	**Kontrol**	43,01±0,948[b]
	Isı stresi	47,11±1,130[a]

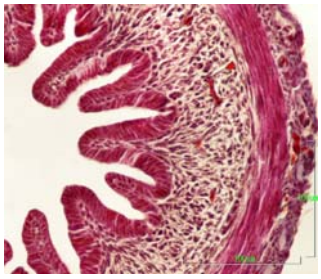
[a,b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

3.2. İnce Bağırsağın Histolojik Gelişimi ve Villuslardan Elde Edilen Histometrik Veriler

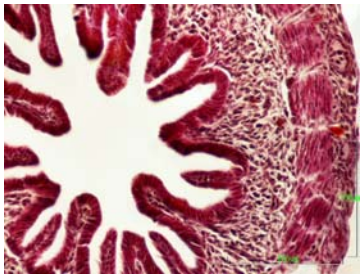
Embriyonik dönem boyunca ince bağırsak morfolojisinin hızla değiştiği, villusların hızla gelişip uzadıkları ve organize oldukları gözlendi. Kuluçkanın 11. (Şekil 3.2, 3.3, 3.4), 13. (Şekil 3.5, 3.6, 3.7) ve 15. (Şekil 3.8, 3.9, 3.10) günlerinde rudimenter haldeki villusların, on sekizinci günde iki farklı yönde organize olmasıyla uzun ve kısa olmak üzere iki farklı villus tipi ortaya çıktı. Onsekizinci günde uzun villusların uç kısımları armut şekilliyken, kısa villusların uçları sivri olup roket benzeri şekil kazanmıştı ve her bir uzun villusun yanında ona komşu bir kısa villus gözlendi (Şekil 3.11, 3.12, 3.13). Kuluçkanın 20. gününde, 18. günde gözlenen villusların şekillerini koruyarak irileştikleri ve boylarının uzadığı dikkati çekti. Ayrıca, az sayıda olmak üzere üçüncü bir villus tipinin gelişmeye başladığı gözlendi (Şekil 3.14, 3.15, 3.16). Yirmi birinci günde villusların hızla uzamaya devam ettiği ve taban kısımlarının tek tarafındaki epitelin alttaki mezenkime invagine olmasıyla kriptlerin şekillenmeye başladığı gözlendi. Bu dönemde villus başına tek bir kript düşecek tarzda şekillenen her kript az sayıda epitel hücresinden oluşmaktaydı (Şekil 3.17, 3.18, 3.19).

İncelenen tüm kuluçka evrelerinde, bağırsak mukoza epiteli tek katlı prizmatik epiteldi. Kuluçkanın 18. gününe kadar ince bağırsağın tüm bölümlerinde Lamina propria-submukoza ayrımı yapılamayan bağdoku, bu dönemde L. muskularisin şekillenmesiyle epitelin hemen altında L. propria ve derinde bulunan submukoza olmak üzere iki bölgeye ayrılmış durumdaydı (Şekil 3.11, 3.12, 3.13). Tunika muskularis ve T. seroza katmanları, incelenen her embriyonik dönemde

mevcuttu. İnce bağırsağın embriyonik gelişim sürecinde kontrol ve ısı stresi grupları arasında histolojik yapısal fark gözlenmedi.



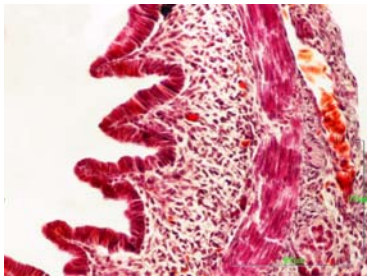
Şekil 3.2. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü Boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



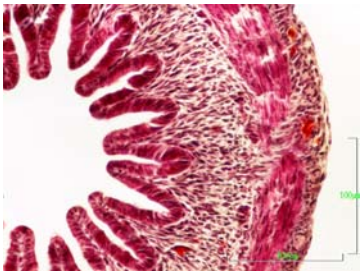
Şekil 3.3. Ross 308 ırkı ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



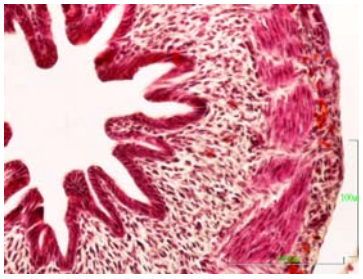
Şekil 3.4. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



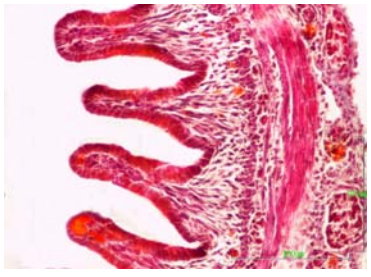
Şekil 3.5. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



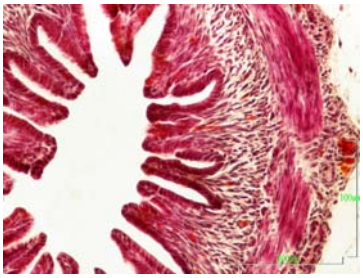
Şekil 3.6. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.7. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



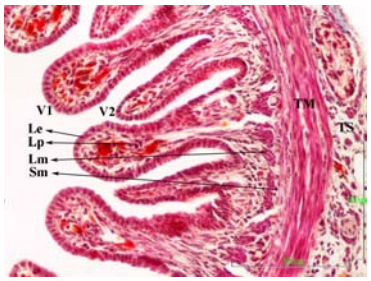
Şekil 3.8. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.9. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



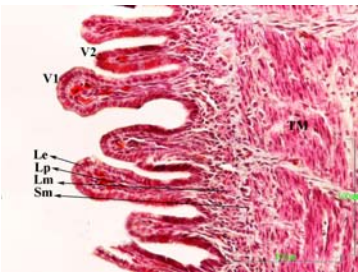
Şekil 3.10. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.11. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



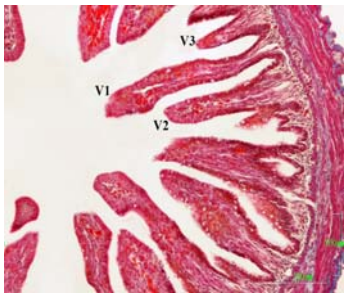
Şekil 3.12. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



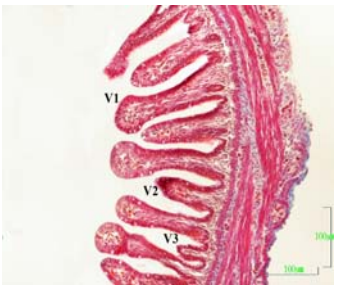
Şekil 3.13. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.

V1:Birinci gelişim aşamasındaki villus, V2: İkinci gelişim aşamasındaki villus.

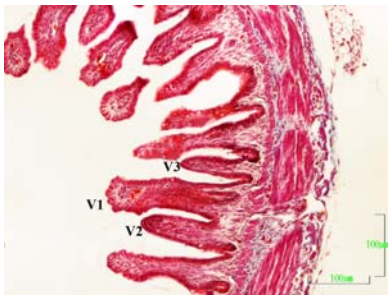
Le: Lamina epiteliyalis, Lp: Lamina propriya, Lm: Lamina muskularis, Sm: Submukoza, TM:Tunika Muskularis, TS: Tunika Seroza.



Şekil 3.14. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



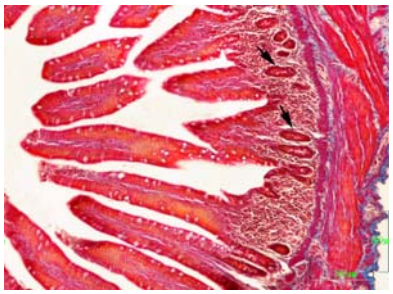
Şekil 3.15. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



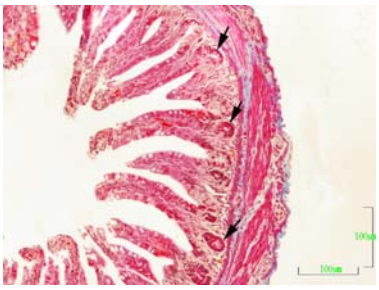
Şekil 3.16. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.

V1:Birinci gelişim aşamasındaki villus, V2: İkinci gelişim aşamasındaki villus,

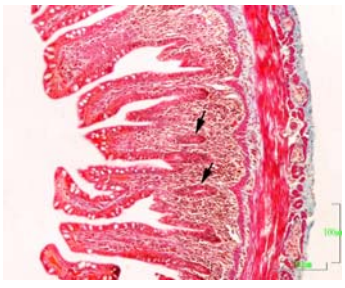
V3: Üçüncü gelişim aşamasındaki villus.



Şekil 3.17. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.18. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.



Şekil 3.19. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Üçlü boyama. Büyütme çizgisi: 100µm.

Oklar: Kriptler.

Grupların çıkış günü ortalama ince bağırsak ağırlıkları Çizelge 3.5.'de verilmiştir. Her iki ırkın ısı stresine maruz bırakılan embriyolarının ortalama rölatif ince bağırsak ağırlığının [(ince bağırsak ağırlığı/embriyo ağırlığı)X100] kontrol grubundan önemli derecede (P<0,05) düşük olduğu dikkati çekmiştir.

Çizelge 3.5. Çıkış gününde tespit edilen ortalama rölatif ince bağırsak ağırlıkları (%).

Irk	Gruplar n=10	İnce bağırsak ağırlığı X±SE
Hybro	**Kontrol**	3,21±0,119[a]
	Isı stresi	2,46±0,291[b]
Ross 308	**Kontrol**	3,51±0,348[a]
	Isı stresi	2,07±0,131[b]

[a,b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Kontrol ve ısı stresi gruplarındaki embriyoların duodenum, jejunum ve ileumundaki birinci gelişme aşamasında bulunan villusların boy, genişlik ve alan verileri sırasıyla Çizelge 3.6, 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Çizelgelerde de görüleceği gibi her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının villus parametreleri arasında önemli fark bulunmamaktadır (P>0,05).

Çizelge 3.6. Kuluçkanın farklı dönemlerinde duodenal villuslardan elde edilen histometrik veriler.

Kuluçka Dönemleri	**Villus parametresi**	**Irklar**			
		Hybro		**Ross 308**	
		Gruplar n=10			
		Kontrol	**Isı Stresi**	**Kontrol**	**Isı Stresi**
18. Gün	Villus boyu (µm)	169,04±4,610	169,72±4,956	169,36±6,754	170,52±6,427
X±SE	Villus Genişliği (µm)	33,70±1,981	35,04±1,119	33,36±2,169	34,78±0,769
	Villus Alanı (μm^2)	5893,80±301,054	6259,84±158,518	5985,98±458,942	6341,72±257,696
20.gün	Villus boyu (µm)	256,76±14,673	255,56±15,204	256,04±9,795	255,08±12,954
X±SE	Villus Genişliği (µm)	39,10±2,895	40,42±1,011	40,74±1,629	40,20±2,263
	Villus Alanı (μm^2)	11178,20±748,765	11509,70±458,414	11652,30±560,875	11404,00±938,790
21. gün	Villus boyu (µm)	355,34±9,560	347,56±5,566	357,30±9,233	353,37±9,881
X±SE	Villus Genişliği (µm)	53,94±2,122	55,14±1,996	54,46±2,262	54,70±1,984
	Villus Alanı (μm^2)	19830,34±367,425	20739,48±650,413	20334,62±797,505	20215,08±761,665

Kontrol ve ısı stresi gruplarının duodenal villuslarından elde edilen ortalama histometrik veriler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$).

Çizelge 3.7. Kuluçkanın farklı dönemlerinde jejunal villuslardan elde edilen histometrik veriler.

Kuluçka Dönemleri	**Villus parametresi**	**Irklar**			
		Hybro		**Ross 308**	
		Gruplar n=10			
		Kontrol	**Isı Stresi**	**Kontrol**	**Isı Stresi**
18. Gün X±SE	Villus boyu (µm)	101,94±3,198	100,12±2,267	99,58±1,513	99,78±2,793
	Villus Genişliği (µm)	25,90±1,766	23,30±1,015	27,10±0,955	23,18±1,423
	Villus Alanı (μm^2)	2623,20±80,040	2519,58±131,526	2712,96±127,158	2244,28±136,530
20.gün X±SE	Villus boyu (µm)	162,20±4,693	161,58±3,702	164,66±4,698	160,76±5,716
	Villus Genişliği (µm)	32,72±1,759	32,82±1,844	33,46±1,472	34,98±2,384
	Villus Alanı (μm^2)	5502,48±219,281	5230,26±315,348	5532,76±252,640	5465,44±275,092
21. gün X±SE	Villus boyu (µm)	223,72±6,383	228,76±6,621	236,14±7,492	228,68±2,964
	Villus Genişliği (µm)	40,48±4,009	41,78±3,289	42,00±3,556	40,72±4,156
	Villus Alanı (μm^2)	9249,46±837,049	9571,74±792,073	10014,82±813,241	9295,20±922,415

Kontrol ve ısı stresi gruplarının jejunal villuslarından elde edilen ortalama histometrik veriler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$).

Çizelge 3.8. Kuluçkanın farklı dönemlerinde ileal villuslardan elde edilen histometrik veriler.

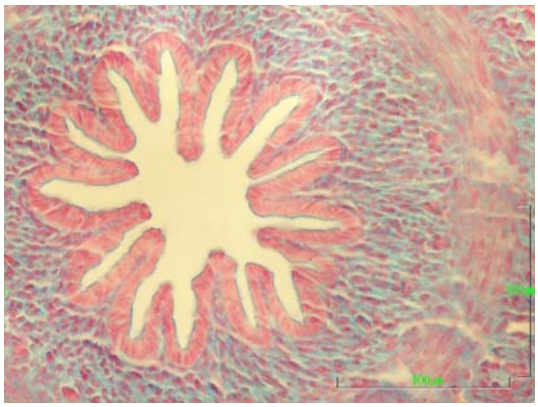
Kuluçka Dönemleri	Villlus parametresi	Irklar			
		Hybro		Ross 308	
		Gruplar n=10			
		Kontrol	Isı Stresi	Kontrol	Isı Stresi
18. Gün X±SE	Villus boyu (µm)	100,02±2,187	97,86±3,044	99,54±2,083	95,36±1,665
	Villus Genişliği (µm)	36,32±2,662	34,60±2,554	36,58±2,310	36,06±2,889
	Villus Alanı (μm^2)	3616,18±283,636	3182,82±92,702	3546,56±215,950	3030,84±304,710
20.gün X±SE	Villus Uzunluğu (µm)	144,00±3,147	143,24±3,230	144,64±3,091	141,86±2,368
	Villus Genişliği (µm)	38,48±2,300	37,38±2,538	38,08±2,584	37,02±1,844
	Villus Yüzey Alanı (μm^2)	5519,46±271,275	4994,30±263,557	5425,38±326,426	5334,52±292,742
21. gün X±SE	Villus boyu (µm)	209,02±6,473	203,66±5,101	206,42±6,745	206,22±7,464
	Villus Genişliği (µm)	42,40±1,284	42,80±1,620	41,56±1,171	42,20±1,669
	Villus Alanı (μm^2)	9048,52±527,875	8879,82±466,588	9175,76±450,534	8992,28±448,898

Kontrol ve ısı stresi gruplarının ileal villuslarından elde edilen ortalama histometrik veriler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$).

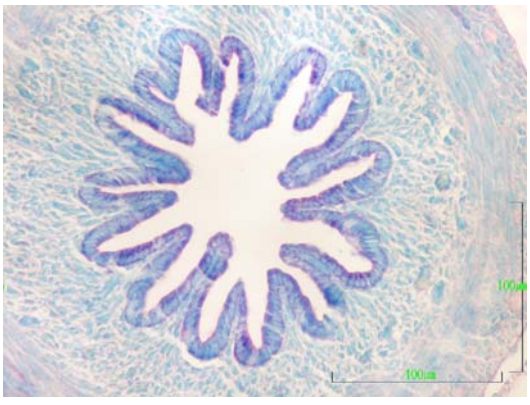
3.3. Kadeh Hücreleri Üzerinde Yapılan İnceleme Sonuçları

PAS yöntemiyle boyanan kesitlerde nötral müsin salgılayan kadeh hücreleri, AB (pH 2,5) ile boyanan kesitlerde de asit müsin salgılayan kadeh hücreleri demonstre edildi. Kadeh hücrelerinin villus boyunca epitel içinde lokalize oldukları gözlendi.

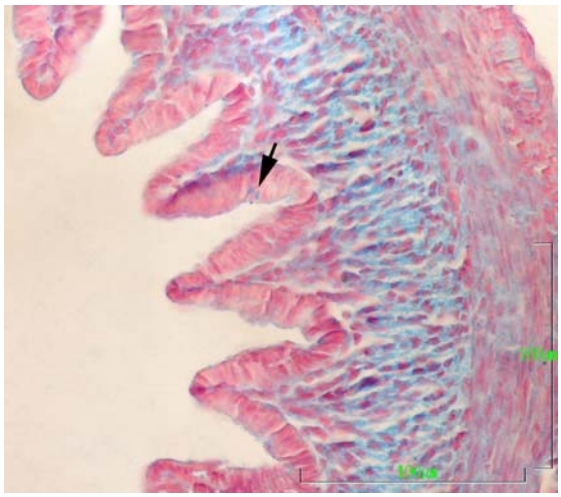
Kontrol ve deney grubundan alınan her iki ırkın bağırsak kesitlerinde AB(+) veya PAS(+) kadeh hücrelerine kuluçkanın 11. gününde rastlanmadı (Şekil 3.20, 3.21). Bağırsak epitelinde kadeh hücrelerine ilk kez kuluçkanın 13. gününde az sayıda rastlandı (Şekil 3.22, 3.23). On beşinci günde sayıları artan kadeh hücrelerinin (Şekil 3.24, 3.25) on sekizinci günde, büyük çoğunluğunun sitoplazması sadece asidik müsin içermekte ve AB(+) reaksiyon vermekteydi (Şekil 3.26, 3.27). Kuluçkanın 13. 15. ve 18. günlerinde az sayıda kadeh hücresi bulunduğundan, kadeh hücresi yoğunlukları sonraki dönemlerde belirlendi. Kuluçkanın 20 ve 21. günlerinde duodenum, jejunum ve ileumdaki PAS(+) ve AB(+) kadeh hücresi yoğunlukları sırasıyla Çizelge 3.9 ve 3.10'da verilmiştir. Yirminci günde kadeh hücresi yoğunlukları ince bağırsağın incelenen bölgelerinin tamamında artmıştı (Şekil 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.33). Çıkış gününde, şekillenmesi yeni başlamış olan rudimenter kriptlerde de kadeh hücrelerine rastlandı (Şekil 3.34, 3.35, 3.36, 3.37, 3.38, 3.39). Her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının kadeh hücresi yoğunlukları birbirine oldukça yakındı ve aradaki fark istatistiksel açıdan önemsizdi (P>0,05).



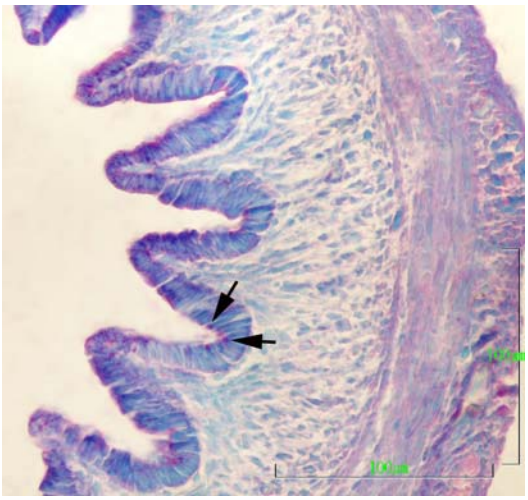
Şekil 3. 20. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Bu dönemde jejunum epitelinde AB(+) kadeh hücresi bulunmamaktadır. AB pH:2.5. Büyütme çizgisi: 100 µm.



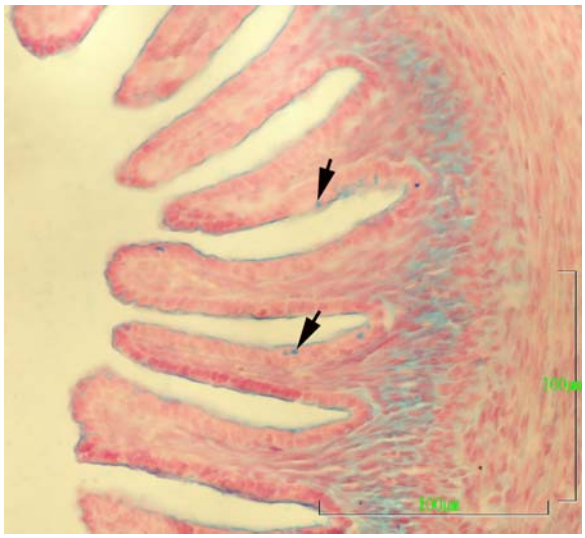
Şekil 3.21. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Bu dönemde jejunum epitelinde PAS(+) kadeh hücresi bulunmamaktadır. PAS. Büyütme Çizgisi: 100µm.



Şekil 3.22. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Ok: AB(+) granüle sahip kadeh hücresi. AB pH:2.5. Büyütme çizgisi: 100 µm.



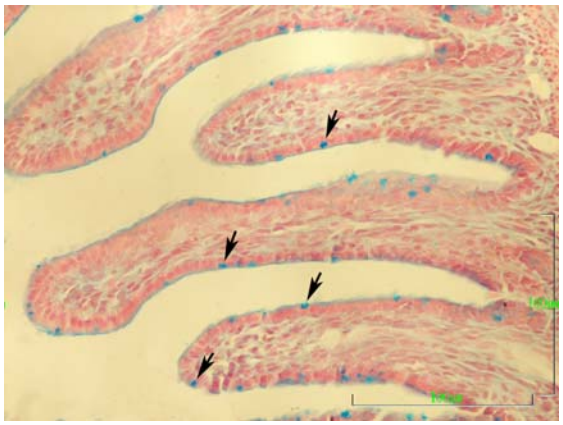
Şekil 3.23. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) granüle sahip kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



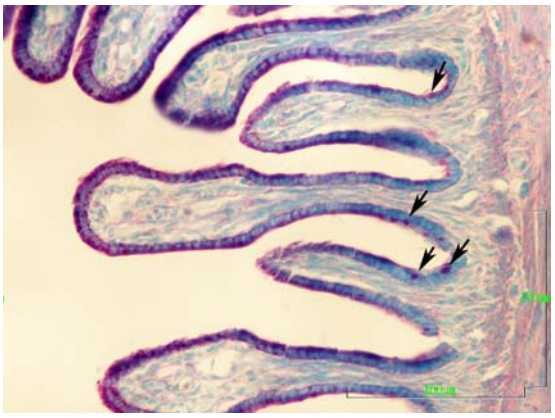
Şekil 3.24. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB pH:2.5. Büyütme çizgisi: 100 µm.



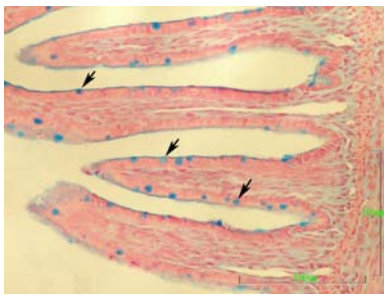
Şekil 3.25. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



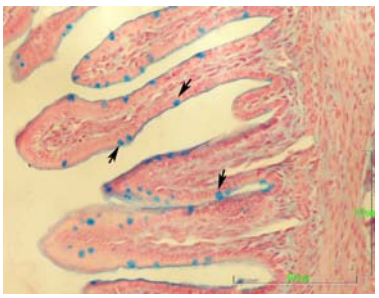
Şekil 3.26. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2.5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



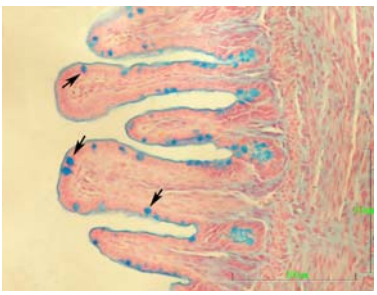
Şekil 3.27. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



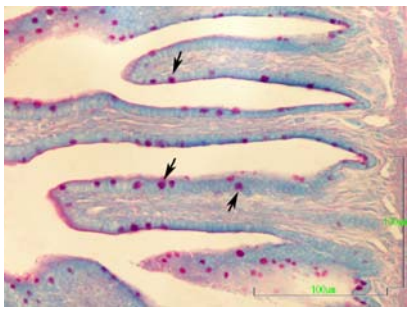
Şekil 3.28. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2,5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



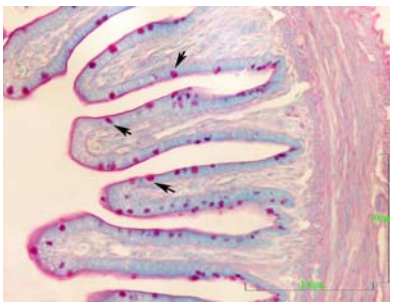
Şekil 3.29. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2,5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



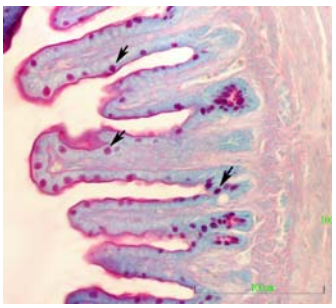
Şekil 3.30. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2,5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



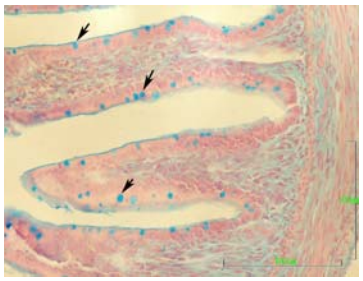
Şekil 3.31. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



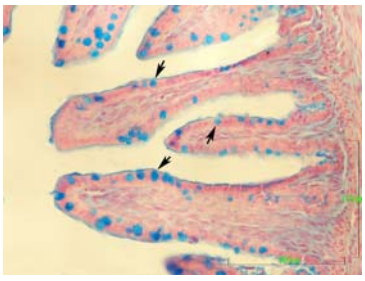
Şekil 3.32. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



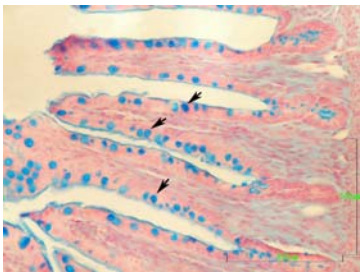
Şekil 3.33. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



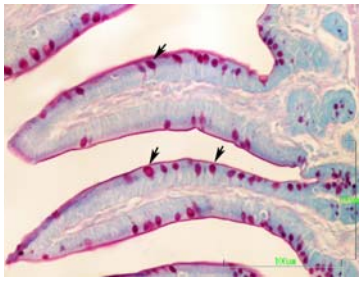
Şekil 3.34. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2.5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



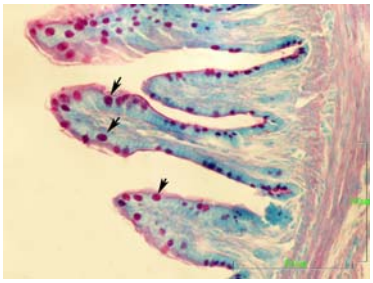
Şekil 3.35. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2.5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



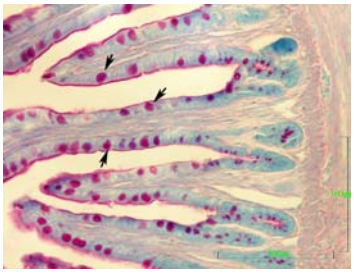
Şekil 3.36. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: AB(+) kadeh hücreleri. AB (pH:2.5). Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.37. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.38. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.39. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: PAS(+) kadeh hücreleri. PAS. Büyütme çizgisi: 100 µm.

Çizelge 3.9. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen PAS (+) kadeh hücresi yoğunlukları (hücre sayısı/birim epitel uzunluğu-100µm-).

Irklar	Gruplar n=10	KULUÇKA DÖNEMLERİ					
		20. GÜN X±SE İnce bağırsak bölümleri			21. GÜN X±SE İnce bağırsak bölümleri		
		Duodenum	Jejunum	İleum	Duodenum	Jejunum	İleum
Hybro	Kontrol	5,08±0,199	5,94±0,359	6,98±0,177	6,34±0,429	7,28±0,371	7,84±0,347
	Isı stresi	5,06±0,244	6,00±0,298	6,92±0,188	6,32±0,434	7,18±0,282	7,82±0,248
Ross	Kontrol	5,12±0,307	6,12±0,263	7,00±0,164	6,74±0,197	7,52±0,248	8,24±0,244
308	Isı stresi	5,10±0,291	6,08±0,276	6,96±0,154	6,56±0,242	7,36±0,225	8,12±0,297

Kontrol ve ısı stresi gruplarının ortalama PAS(+) kadeh hücresi yoğunlukları arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$).

Çizelge 3.10. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen AB (+) kadeh hücresi yoğunlukları (hücre sayısı/birim epitel uzunluğu-100µm-).

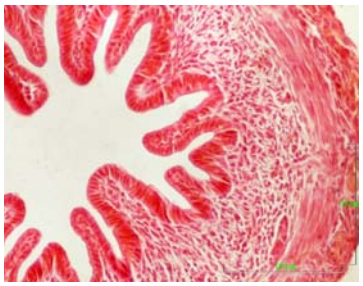
Irklar	Gruplar n=10	KULUÇKA DÖNEMLERİ					
		20. GÜN X±SE İnce bağırsak bölümleri			21. GÜN X±SE İnce bağırsak bölümleri		
		Duodenum	Jejunum	İleum	Duodenum	Jejunum	İleum
Hybro	Kontrol	4,48±0,199	5,48±0,174	5,50±0,450	6,38±0,220	7,30±0,288	7,44±0,293
	Isı stresi	4,76±0,311	5,60±0,164	5,32±0,425	5,98±0,222	7,42±0,263	7,40±0,263
Ross	Kontrol	4,24±0,181	5,56±0,129	5,34±0,395	6,28±0,390	7,26±0,312	7,66±0,336
308	Isı stresi	4,56±0,350	5,54±0,225	5,24±0,349	5,52±0,269	7,18±0,121	8,06±0,342

Kontrol ve ısı stresi gruplarının ortalama AB(+) kadeh hücresi yoğunlukları arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir ($p>0,05$).

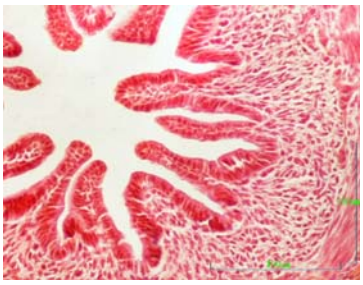
3.4. Enteroendokrin Hücreler Üzerinde Yapılan İnceleme Sonuçları

Masson-Fontana'nın Argentaffin ve Grimelius'un Argirofil gümüşleme yöntemleriyle boyanan kesitlerde enteroendokrin hücreler; kuluçkanın 13. gününden itibaren villus epiteli boyunca ve hem intraepitelyal ve hem de subepitelyal konumda lokalize olan, siyah granüllü hücreler halinde gözlendi.

Kuluçkanın 11. gününde, bağırsağın incelenen bölümlerinin hiçbirinde enteroendokrin hücreye rastlanmadı (Şekil 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.45). On üçüncü günde ise sadece duodenumda tek tük argirofil hücre görüldüğü halde (Şekil 3.46), argentaffin hücreye rastlanmadı (Şekil 3.47). Kuluçkanın 15. gününde, ince bağırsağın duodenum (Şekil 3.48, 3.49) ve jejunum (Şekil 3.50, 3.51) bölümlerinin her ikisinde de hem argirofil ve hem de argentaffin hücre tipleri görüldüğü halde, bu dönemde ileumda enteroendokrin hücreye rastlanmadı (Şekil 3.52, 3.53). Kuluçkanın 18. (Şekil 3.54, 3.55, 3.56) ve 20. (Şekil 3.57, 3.58, 3.59) günlerinde ince bağırsağın her üç bölgesinde de hem argirofil hem de argentaffin hücrelerin villus boyunca intraepitelyal ve subepitelyal konumda lokalize oldukları gözlendi. On sekizinci günden itibaren, ince bağırsağın incelenen bölümlerinin tamamındaki villusların çoğunda, sayıları 1-4 adet arasında değişen enteroendokrin hücre bulunmaktaydı ve çıkış gününde endokrin hücre sayısında önemli bir artış tespit edilmedi. Çıkış gününde kriptlerde de endokrin hücrelere rastlandı (Şekil 3.60, 3.61, 3.62, 3.63). Piramidal ve oval şekilli argirofil ve argentaffin hücrelerin granüllerinin hücrenin bazal yarımında lokalize oldukları dikkati çekti (Şekil 3.54, 3.57). Her iki ırka da gruplar arasında villus başına düşen entero-endokrin hücre sayısı ve bunların lokalizasyonlarında belirgin fark tespit edilmedi.



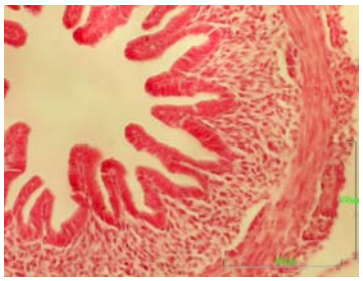
Şekil 3.40. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Bu dönemde duodenum epitelinde argirofil hücre bulunmamaktadır. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



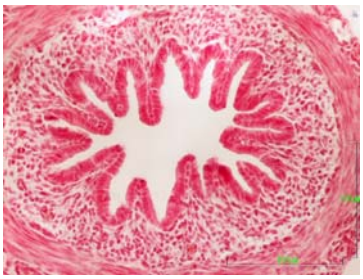
Şekil 3.41. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir, Bu dönemde jejunum epitelinde argirofil hücre bulunmamaktadır. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.42. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Bu dönemde ileum epitelinde argirofil hücre bulunmamaktadır. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



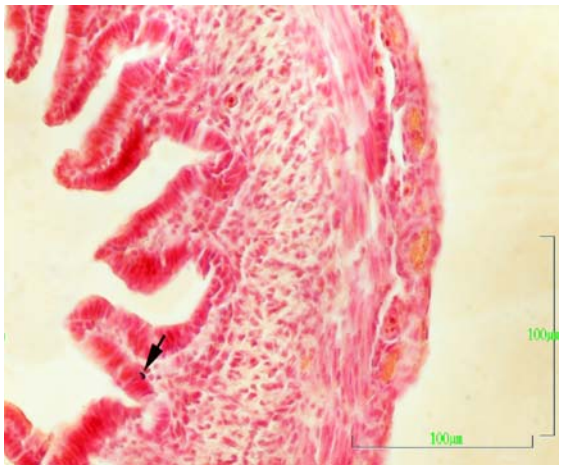
Şekil 3.43. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Bu dönemde duodenum epitelinde argentaffin hücre bulunmamaktadır. Mason-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100µm.



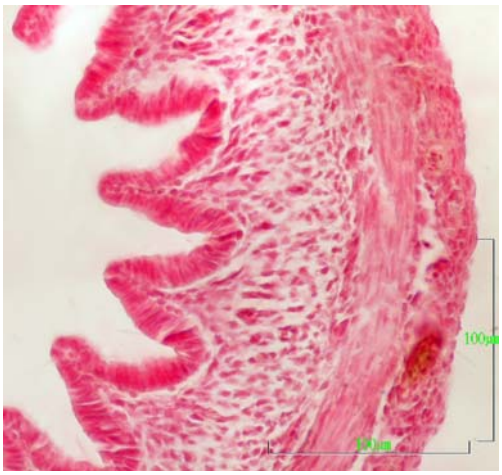
Şekil 3.44. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Bu dönemde jejunum epitelinde argentaffin hücre bulunmamaktadır. Mason-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



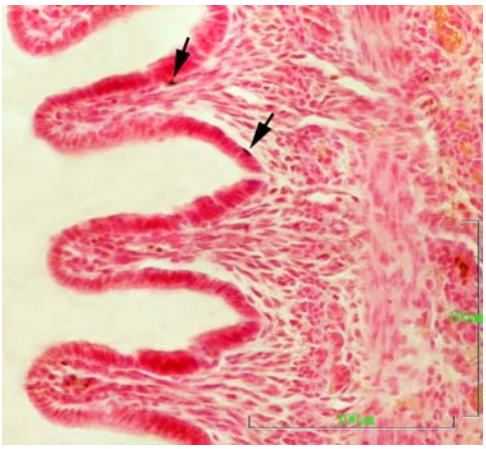
Şekil 3.45. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Bu dönemde ileum epitelinde argentaffin hücre bulunmamaktadır. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.46. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Ok: Argirofil hücre. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.47. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Bu dönemde duodenum epitelinde argentaffin hücre bulunmamaktadır. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



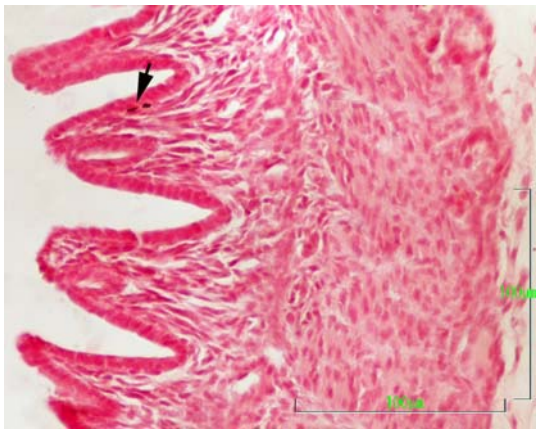
Şekil 3.48. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



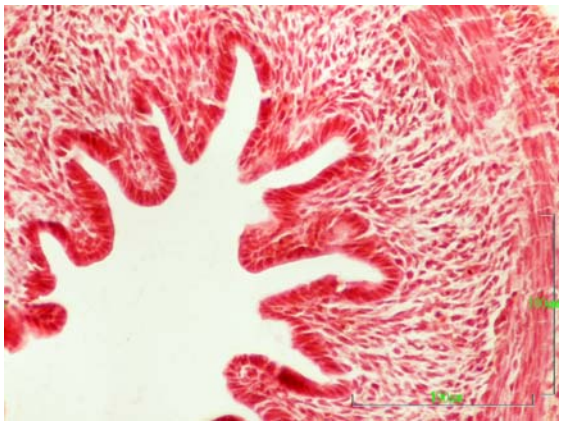
Şekil 3.49. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



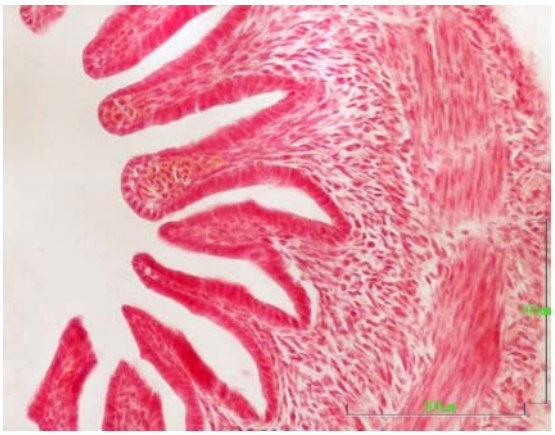
Şekil 3.50. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Ok: Argirofil hücre. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.51. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Ok: Argentaffin hücre. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



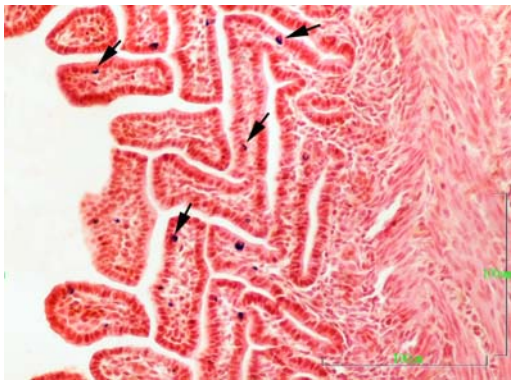
Şekil 3.52. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Bu dönemde ileum epitelinde argirofil hücre bulunmamaktadır. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



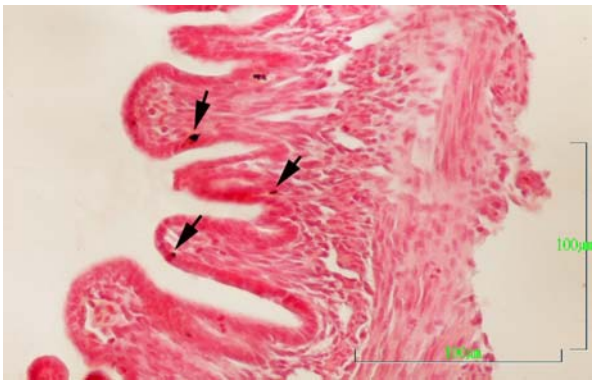
Şekil 3.53. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Bu dönemde ileum epitelinde argentaffin hücre bulunmamaktadır. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



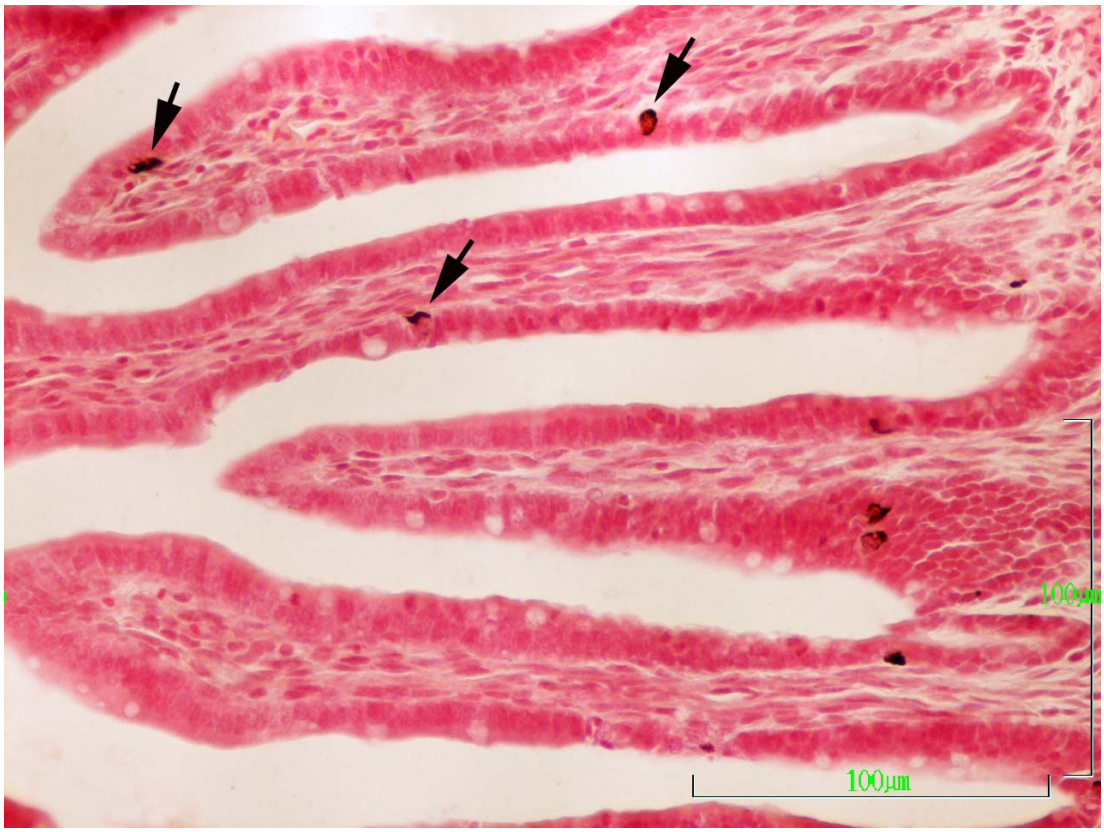
Şekil 3.54. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



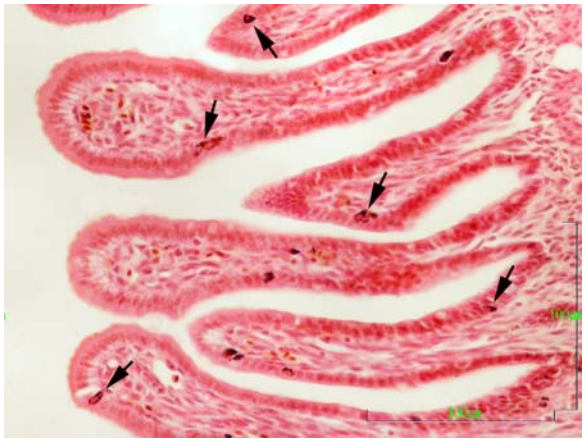
Şekil 3.55. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



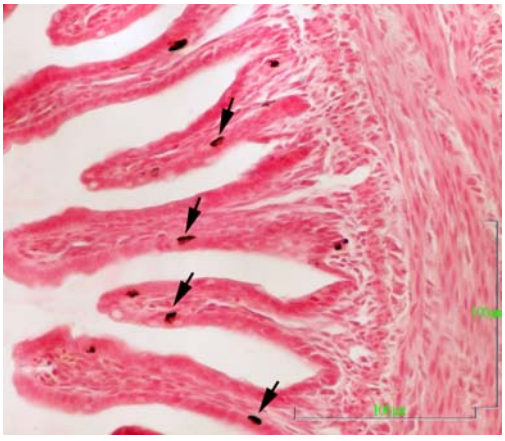
Şekil 3.56. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.57. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



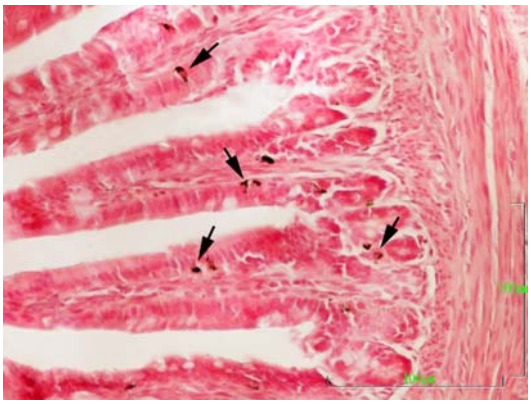
Şekil 3.58. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



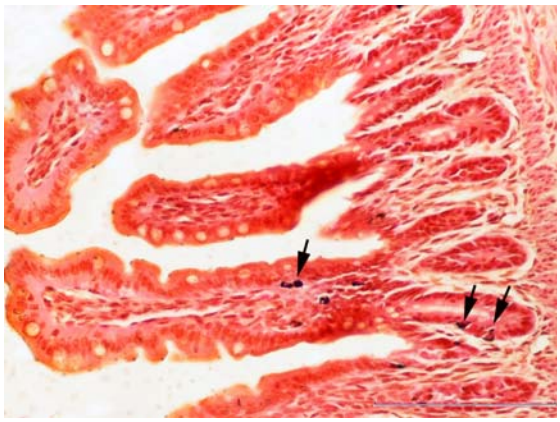
Şekil 3.59. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



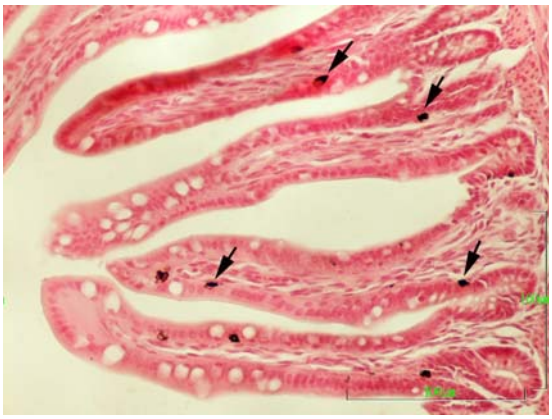
Şekil 3.60. Hybro ırkı kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.61. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.62. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: Argirofil hücreler. Grimelius'un Argirofil boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.



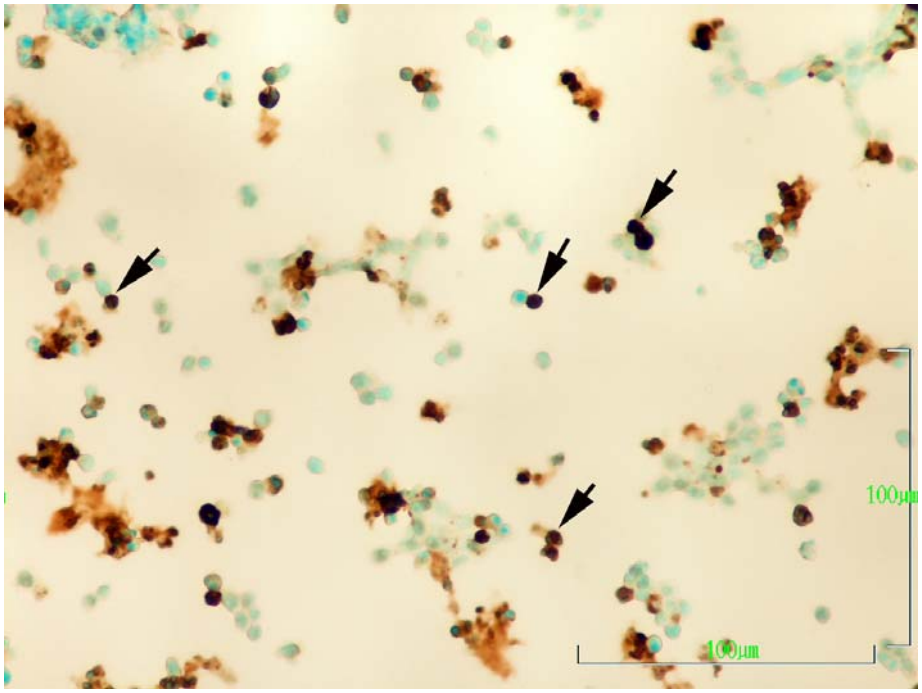
Şekil 3.63. Ross 308 ırkı kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: Argentaffin hücreler. Masson-Fontana'nın Argentaffin boyası. Büyütme çizgisi: 100 µm.

3.5. Apoptozis Bulguları

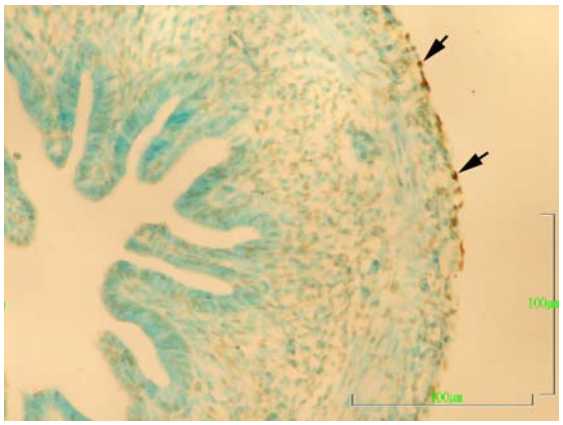
Bu amaçla yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda, pozitif kontrol preparatlarında (Şekil 3.64) olduğu gibi karakteristik kahverengi çekirdeğe sahip hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

Kuluçkanın 11., 13., 15. ve 18. günlerinde apoptotik hücrelere mezotelyumda fazla sayıda rastlanırken, epitelde tek tük apoptotik hücre gözlendi (Şekil 3.65, 3.66, 3.67) Kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde apoptotik hücrelere mezotelyumun yanı sıra villusların apeks bölgelerindeki epitelde de rastlandı (Şekil 3.68, 3.69, 3.70) Ayrıca, bağırsak lümenine dökülen epitel hücrelerinin de apoptotik hücreler oldukları dikkati çekti. İncelenen kuluçka dönemlerinde, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarındaki

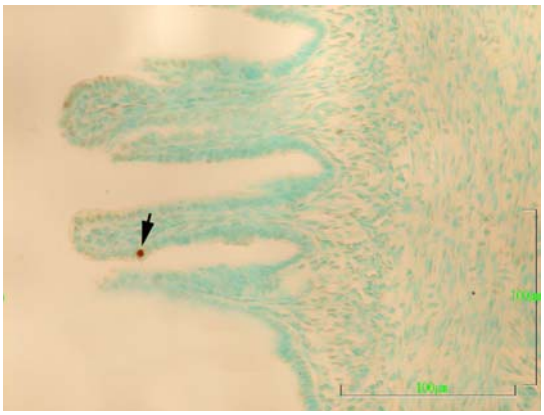
apoptotik hücrelerin lokalizasyon ve villus başına düşen apoptotik hücre sayıları arasında önemli farklar gözlenmedi.



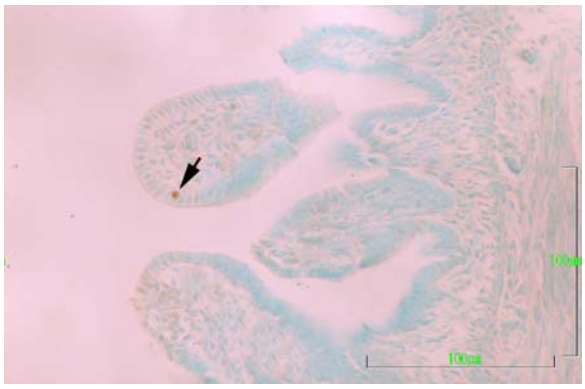
Şekil 3.64. Pozitif kontrol preparatı: Ondokuz saat boyunca 0,5 µg/ml aktinomisinle inkübe edilen HL60 hücreleri. Oklar: Apoptotik hücreler. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.



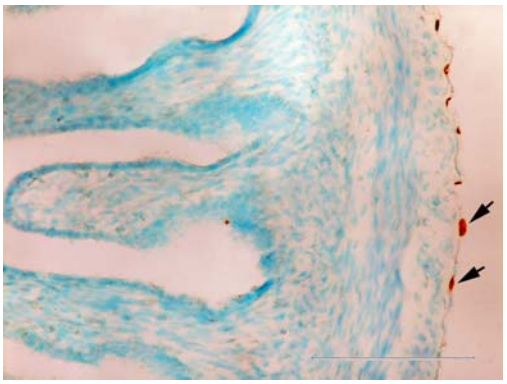
Şekil 3.65. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Mezotelyumda apoptotik hücreler. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.



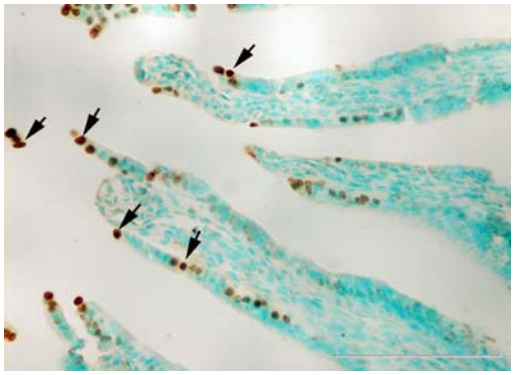
Şekil 3.66. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Ok: Apoptotik epitel hücresi. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.



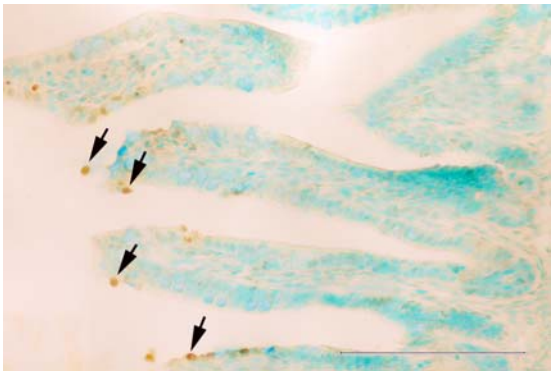
Şekil 3.67. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Ok: Apoptotik epitel hücresi. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.68. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Mezotelyumda apoptotik hücreler. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.69. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: Apoptotik epitel hücreleri. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.

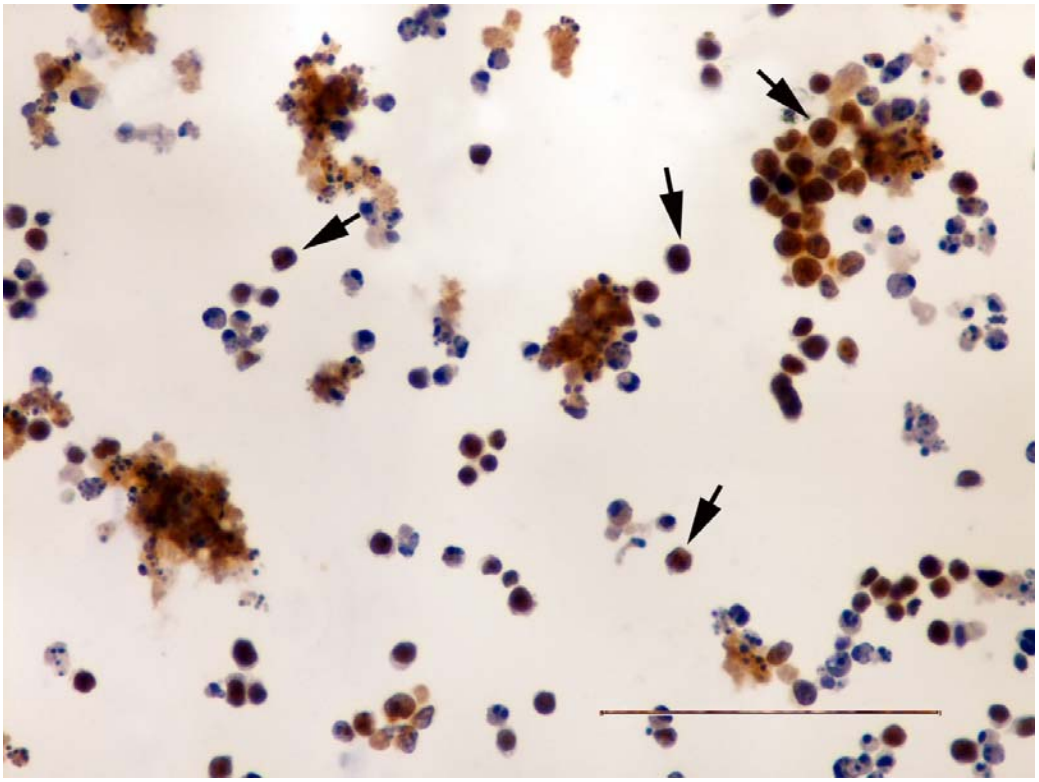


Şekil 3.70. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: Apoptotik epitel hücreleri. TUNEL. Büyütme çizgisi: 100 µm.

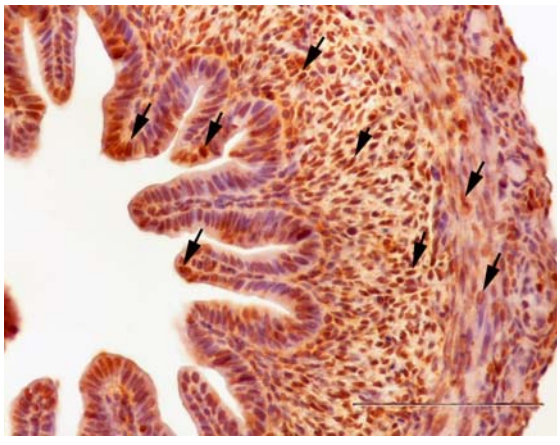
3.6. PCNA Bulguları

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda, pozitif kontrol preparatlarındaki (Şekil 3.71) DAB'a özgü kahverengi çekirdeğe sahip hücreler PCNA(+) hücreler olarak değerlendirildi.

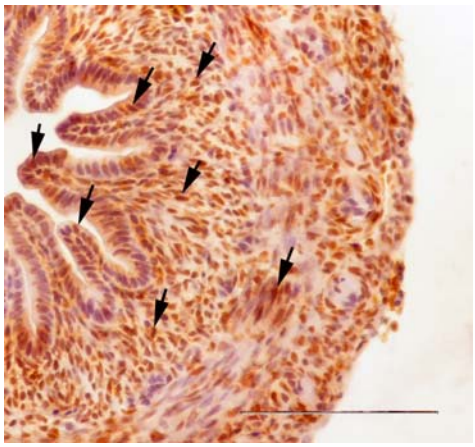
İncelenen bütün dönemlerde epitel dokusu, bağ ve kas dokularında PCNA(+) hücreler görüldü (Şekil 3.72, 3.73, 3.74, 3.75, 3.76). Kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde, grupların tamamında, epitel hücrelerinin büyük çoğunluğu PCNA(+) hücrelerdi (Şekil 3.78, 3.79, 3.80) Ayrıca 21. günde kript epitel hücrelerinin hemen hemen tamamı da PCNA(+) hücrelerden oluşmaktaydı (Şekil 3.81). İncelenen kuluçka dönemlerinde, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının PCNA(+) hücre yoğunluklarıyla bu hücrelerin lokalizasyonları arasında önemli fark tespit edilmedi.



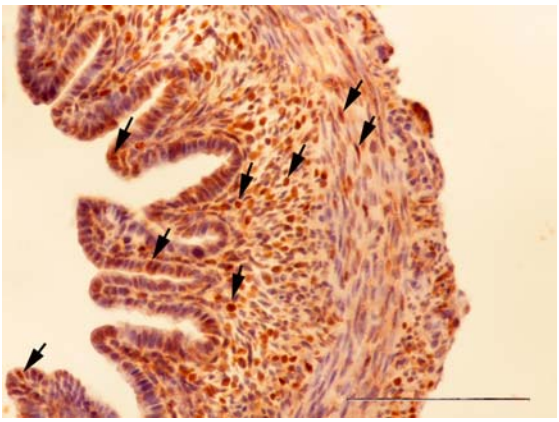
Şekil 3.71. Pozitif kontrol preparatı: HL 60 hücreleri. Oklar: PCNA (+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



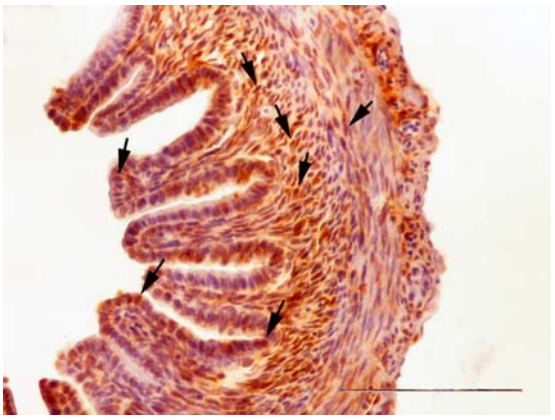
Şekil 3.72. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



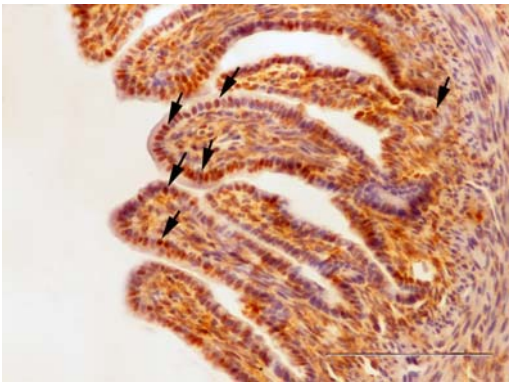
Şekil 3.73. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA (+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



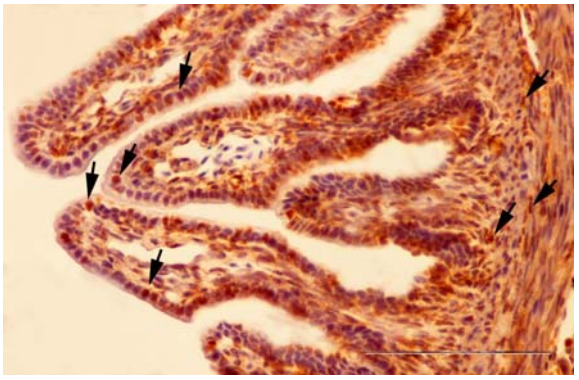
Şekil 3.74. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



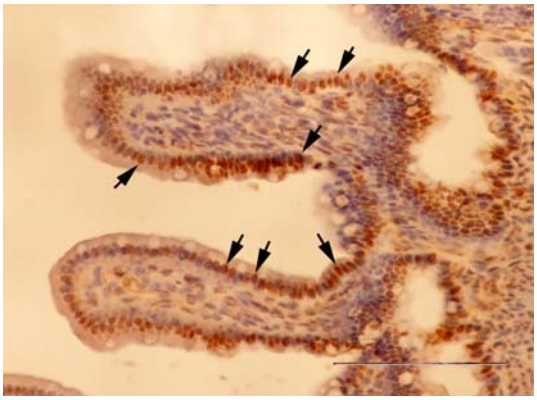
Şekil 3.75. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



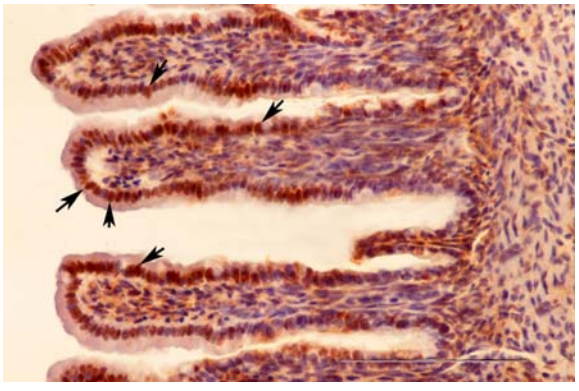
Şekil 3.76. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



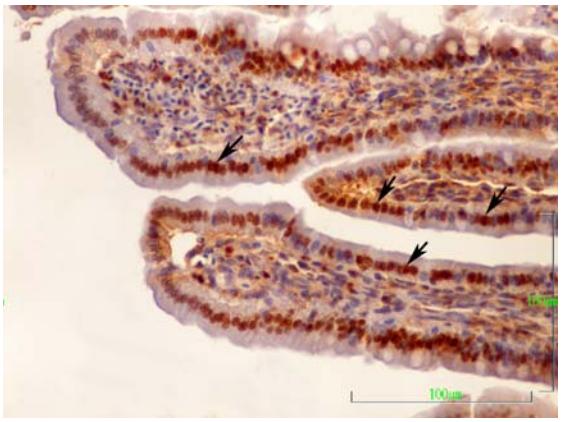
Şekil 3.77. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



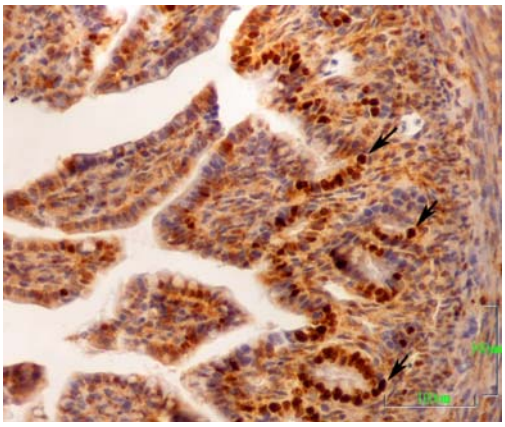
Şekil 3.78. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.79. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.80. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.81. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: PCNA(+) hücreler. PCNA immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.

3.7. HSP70 Bulguları

İmmünohistokimyasal yöntemle yapılan boyamada hücrelerin sitoplazmalarında görülen tipik kahverengi DAB reaksiyonu veren hücreler Hsp70 (+) olarak değerlendirildi.

İncelenen kuluçka dönemlerinin hepsinde, en zayıf Hsp70 pozitivitesi kas dokusunda gözlendi. Bununla birlikte, endotel hücrelerinde Hsp70 pozitivitesi oldukça güçlüydü. Kuluçkanın 11.,13.,15.,18., 20. ve 21. günlerinde epitel dokusu ile bağ ve kas dokularındaki Hsp70 pozitivitesinin semikantitatif skorlanmasıyla duodenum, jejunum ve ileumdan elde edilen veriler sırasıyla, Çizelge 3.11, 3.12, 3.13'te verilmiştir. Çizelgelerde de görüldüğü gibi her iki ırkta da incelenen bütün dönemlerde, kontrol ve ısı stresi gruplarında değişik derecelerde Hsp70 pozitivitesi gözlenmektedir. Bununla birlikte, hem kontrol ve hem de ısı stresi gruplarında embriyonik yaşın ilerlemesiyle birlikte özellikle bağdoku hücrelerinde Hsp70 pozitivitesi zayıflamaktadır. Epitel hücrelerinde gözlenen pozitivite, genel olarak her iki ırkın ısı stresi gruplarında kontrol grubundan daha güçlü olmakla birlikte, kuluçkanın 11. (Şekil 3.82, 3.83), 13. (Şekil 3.84, 3.85), 15. ve 18. (Şekil 3.86, 3.87) günlerinde aradaki fark önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur. Kuluçkanın 20. gününde (Şekil 3.88, 3.89, 3.90, 3.91) duodenumda ve 21. gününde (Şekil 3.92, 3.93, 3.94, 3.95, 3.96, 3.97) bağırsağın her üç bölgesinde ısı stresi gruplarında Hsp70 önemli derecede ($P<0,05$) daha güçlü pozitivite göstermektedir.

Kuluçkanın 11.,13. ve 15. günlerinde bağ dokusundaki Hsp70 pozitivitesi daha güçlü iken, 18. günden itibaren bu bölgedeki pozitivitenin hızla zayıfladığı belirlendi. Kuluçkanın 18. gününde, L. propria'daki fibroblastların Hsp70 pozitivitesi, submukozadaki fibroblastlarınkinden daha güçlüydü (Şekil 3.86, 3.87). İncelenen her iki broiler ırkının, kontrol ve ısı stresi gruplarının bağ dokusu hücrelerindeki Hsp70 pozitivitesi birbirine oldukça yakın düzeydeydi (P>0,05).

Çizelge 3.11. Kuluçkanın farklı dönemlerinde duodenumda tespit edilen semikantitatif Hsp70 pozitivite sonuçları.

Kuluçka dönemleri	İncelenen doku	Irklar			
		Hybro		Ross 308	
		Gruplar n=5			
		Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE	Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE
11. gün	**Epitel d.**	3,00±0,274	3,40±0,245	2,60±0,187	3,20±0,200
	Bağ d.	3,70±0,123	3,60±0,187	3,70±0,200	3,70±0,123
	Kas d.	1,90±0,100	2,30±0,339	2,10±0,100	2,10±0,245
13. gün	**Epitel d.**	2,70±0,255	2,70±0,123	2,50±0,158	3,10±0,400
	Bağ d.	3,30±0,200	3,20±0,123	3,50±0,158	3,60±0,100
	Kas d.	0,90±0,245	0,90±0,100	0,80±0,123	0,90±0,100
15. gün	**Epitel d.**	2,20±0,300	2,60±0,187	2,30±0,123	2,40±0,292
	Bağ d.	2,90±0,292	3,10±0,187	2,80±0,123	3,00±0,274
	Kas d.	0,60±0,100	0,80±0,123	0,60±0,100	0,90±0,292
18. gün	**Epitel d.**	2,00±0,158	2,70±0,374	2,00±0,158	2,50±0,224
	Bağ d.	2,10±0,332	2,50±0,447	1,80±0,200	2,40±0,187
	Kas d.	0,80±0,123	0,80±0,255	0,70±0,123	0,80±0,255
20. gün	**Epitel d.**	2,30±0,464^{ab}	3,20±0,339^{a}	1,70±0,200^{b}	3,20±0,200^{a}
	Bağ d.	1,60±0,367	1,50±0,224	1,10±0,292	1,40±0,292
	Kas d.	0,20±0,123	0,80±0,339	0,30±0,123	0,60±0,187
21. gün	**Epitel d.**	1,70±0,436^{bc}	3,30±0,200^{a}	1,10±0,100^{c}	3,00±0,274^{ab}
	Bağ d.	0,90±0,100^{b}	1,70±0,123^{a}	1,20±0,123^{b}	1,20±0,123^{b}
	Kas d.	0,20±0,123^{b}	0,90±0,100^{a}	0,20±0,123^{b}	0,90±0,187^{a}

^{a,b,c}Aynı satırda farklı harflelerle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Çizelge 3.12. Kuluçkanın farklı dönemlerinde jejunumda tespit edilen semikantitatif Hsp70 pozitivite sonuçları.

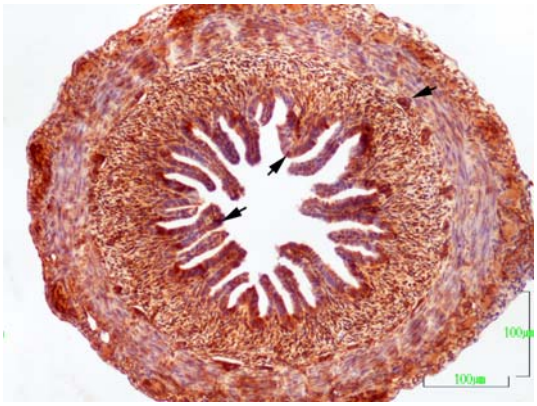
Kuluçka dönemleri	İncelenen doku	Irklar			
		Hybro		Ross 308	
		Gruplar n=5			
		Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE	Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE
11. gün	**Epitel d.**	2,80±0,123	3,20±0,200	2,70±0,123	3,20±0,339
	Bağ d.	3,60±0,187	3,60±0,187	3,50±0,224	3,60±0,245
	Kas d.	1,40±0,245	2,20±0,200	1,60±0,245	2,30±0,339
13. gün	**Epitel d.**	2,60±0,187	2,80±0,339	2,50±0,158	3,00±0,274
	Bağ d.	3,50±0,158	3,70±0,123	3,70±0,123	3,70±0,123
	Kas d.	1,30±0,200	1,20±0,123	1,20±0,200	1,40±0,187
15. gün	**Epitel d.**	1,82±0,472	2,10±0,100	2,00±0,158	1,70±0,123
	Bağ d.	2,80±0,200	3,30±0,300	2,90±0,187	2,80±0,200
	Kas d.	0,60±0,100	0,80±0,339	0,70±0,123	0,70±0,200
18. gün	**Epitel d.**	2,10±0,292	2,30±0,123	2,10±0,292	2,20±0,255
	Bağ d.	2,50±0,158	2,20±0,200	2,30±0,300	2,40±0,187
	Kas d.	0,60±0,187	0,70±0,200	0,80±0,200	0,70±0,123
20. gün	**Epitel d.**	2,20±0,374	3,10±0,367	1,70±0,464	3,10±0,367
	Bağ d.	1,60±0,291	1,80±0,200	1,20±0,374	2,30±0,200
	Kas d.	0,50±0,224	1,00±0,224	0,40±0,187	0,80±0,255
21. gün	**Epitel d.**	1,50±0,316^{b}	2,60±0,187^{a}	1,10±0,100^{c}	2,50±0,224^{ab}
	Bağ d.	0,90±0,100^{b}	2,00±0,354^{a}	1,00±0,274^{ab}	1,80±0,255^{a}
	Kas d.	0,30±0,200	0,60±0,187	0,40±0,187	0,80±0,123

^{a,b,c}Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

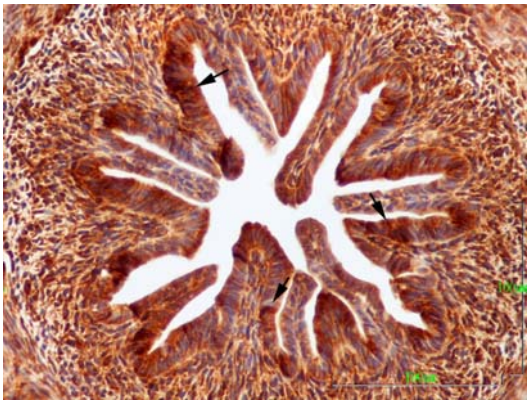
Çizelge 3.13. Kuluçkanın farklı dönemlerinde ileumda tespit edilen semikantitatif Hsp70 pozitivite sonuçları.

Kuluçka dönemleri	İncelenen doku	Irklar			
		Hybro		Ross 308	
		Gruplar n=5			
		Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE	Kontrol X±SE	Isı stresi X±SE
11. gün	**Epitel d.**	2,80±0,339	3,10±0,367	2,70±0,123	3,10±0,339
	Bağ d.	3,60±0,187	3,60±0,245	3,50±0,224	3,60±0,245
	Kas d.	1,60±0,245	2,20±0,200	1,40±0,245	2,30±0,339
13. gün	**Epitel d.**	2,70±0,123	2,80±0,200	2,60±0,100	2,70±0,123
	Bağ d.	3,50±0,158	3,60±0,100	3,30±0,123	3,40±0,100
	Kas d.	1,40±0,245	1,60±0,245	1,40±0,245	1,60±0,245
15. gün	**Epitel d.**	2,40±0,187	2,50±0,158	2,20±0,255	2,50±0,158
	Bağ d.	2,80±0,123	3,00±0,274	3,00±0,274	3,00±0,274
	Kas d.	0,80±0,123	0,80±0,339	0,70±0,123	0,90±0,292
18. gün	**Epitel d.**	2,30±0,200	2,70±0,255	2,20±0,125	2,40±0,187
	Bağ d.	2,50±0,316	2,50±0,447	2,10±0,187	2,30±0,255
	Kas d.	0,60±0,100	0,90±0,245	0,70±0,123	0,70±0,123
20. gün	**Epitel d.**	2,20±0,374^{b}	3,10±0,100^{b}	2,00±0,474^{b}	3,40±0,245^{a}
	Bağ d.	1,10±0,245	1,50±0,224	0,90±0,292	1,90±0,400
	Kas d.	0,40±0,187	0,60±0,100	0,50±0,224	1,00±0,224
21. gün	**Epitel d.**	1,60±0,400^{ab}	2,50±0,224^{a}	1,20±0,200^{b}	2,80±0,374^{a}
	Bağ d.	1,00±0,224	1,40±0,187	0,90±0,292	1,60±0,245
	Kas d.	0,40±0,187	0,50±0,158	0,20±0,123	0,70±0,123

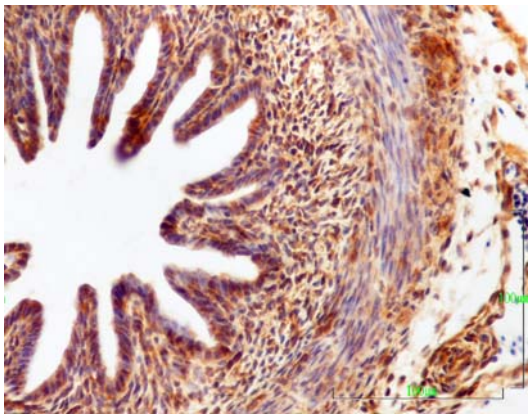
^{a,b}Aynı satırda farklı harfle ifade ortalama edilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



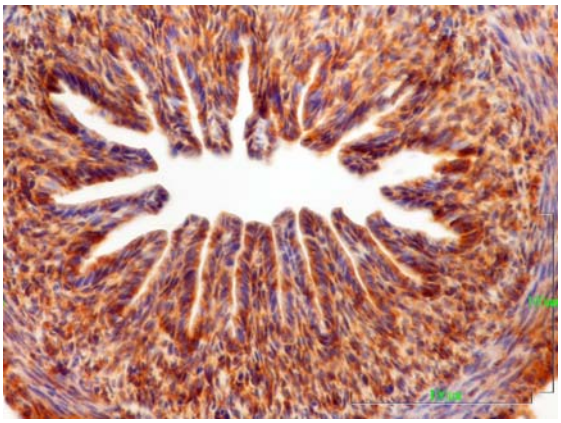
Şekil 3.82: Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Oklar:Hsp70 pozitif hücreler. Büyütme çizgisi: 100 µm.



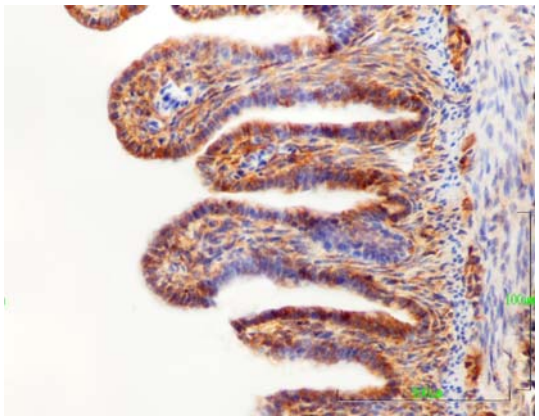
Şekil 3.83. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Oklar:Hsp70 pozitif hücreler. Büyütme çizgisi: 100 µm.



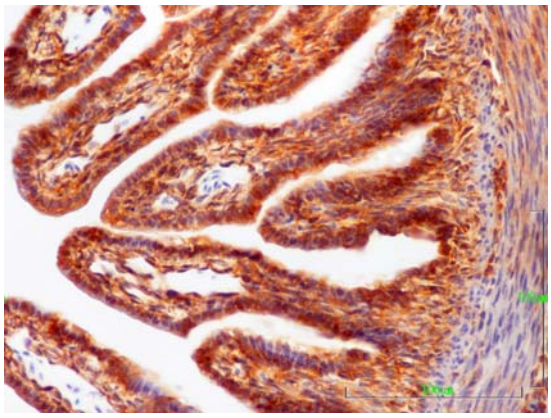
Şekil 3.84. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



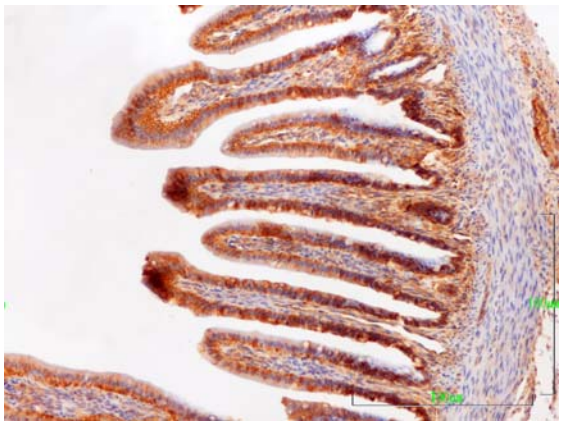
Şekil 3.85. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



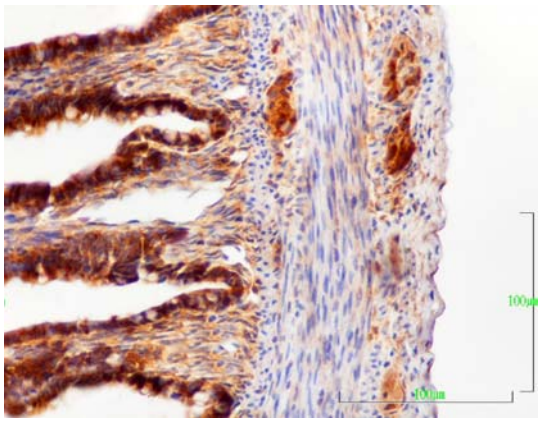
Şekil 3.86. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



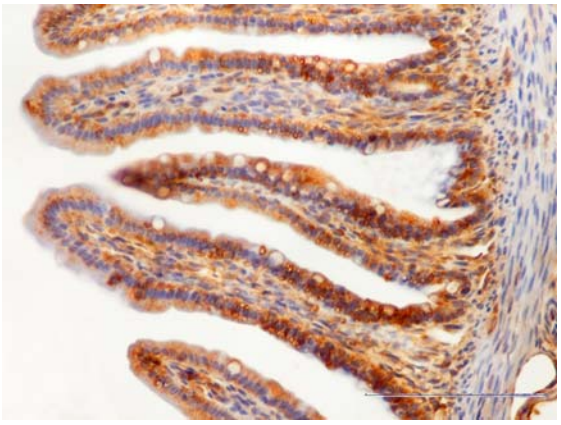
Şekil 3.87. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



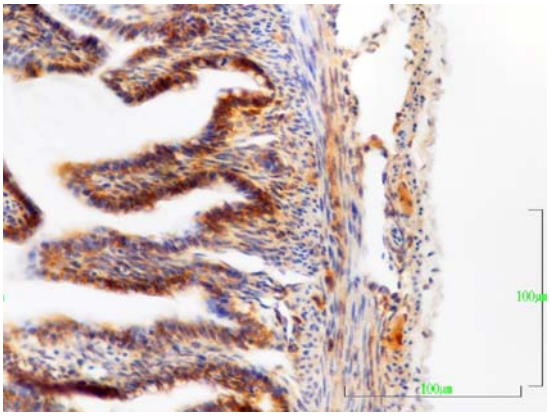
Şekil 3.88. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



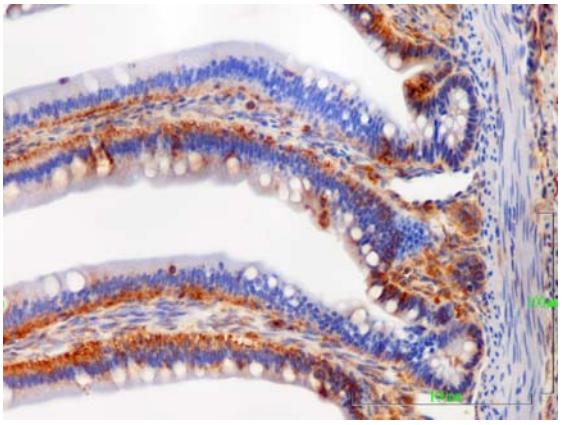
Şekil 3.89. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



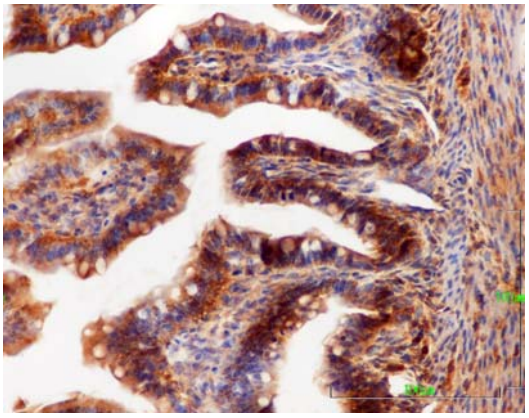
Şekil 3.90. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. gününde jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



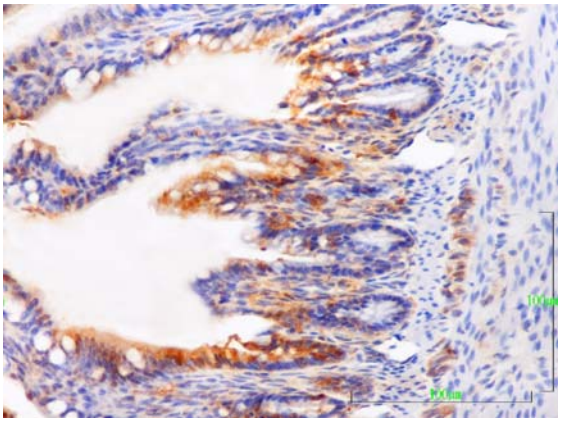
Şekil 3.91. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



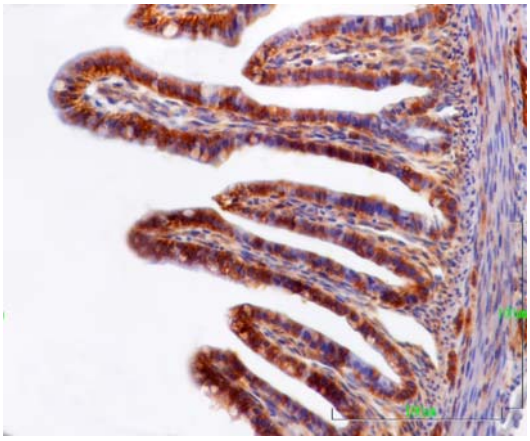
Şekil 3.92. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



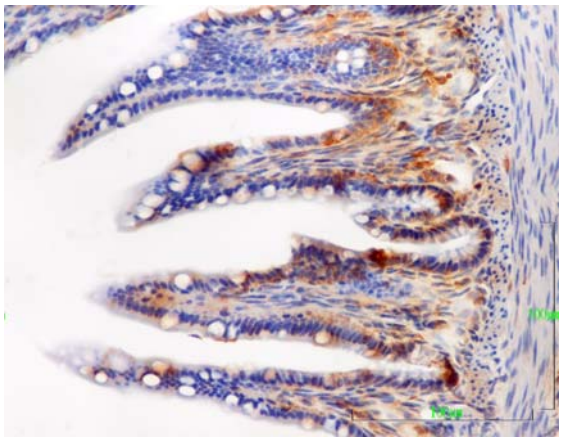
Şekil 3.93. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



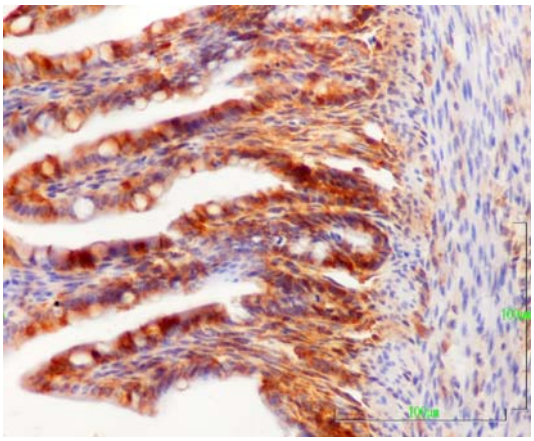
Şekil 3.94. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.95. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.96. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.97. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Hsp70 immünohistokimyasal boyaması. Büyütme çizgisi: 100 µm.

3.8. ALP Demonstrasyonu Bulguları

Enzimhistokimyasal boyama sonucunda kesitlerde ALP pozitivitesi, enterositlerin fırça kenarında lokalize olan kırmızı renkli reaksiyon halinde gözlendi.

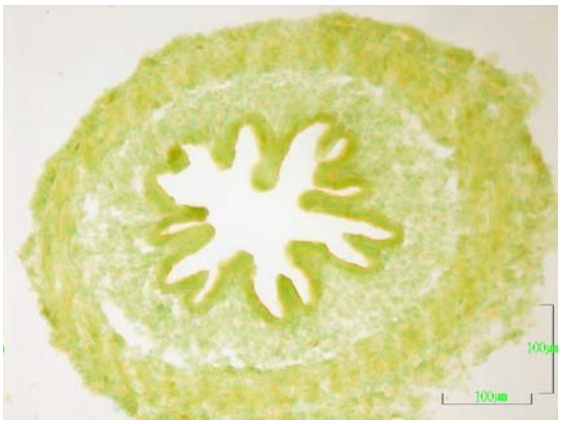
Kuluçkanın 11. (Şekil 3.98) ve 13.(Şekil 3.99) günlerinde, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi grubundaki embriyoların ince bağırsaklarının duodenum, jejunum ve ileum bölgelerinden alınan kesitlerinde ALP reaksiyonu gözlenmedi. Kuluçkanın 15. gününde, sadece duodenum ve jejunum epitelinin lüminal yüzünde kopuntulu seyreden zayıf bir ALP reaksiyonu görüldü (Şekil 3.100). Kuluçkanın 18. gününde villusların apeksinin fırça kenarlarında güçlü ALP aktivitesi gözlenirken, lateral yüzde reaksiyon daha zayıf olup bazal bölge epitelinde pozitivite gözlenmedi (Şekil 3.101, 3.102, 3.103, 3.104). Kuluçkanın 20. gününde ise, villusların hem apeks ve hem de lateral yüz epitelinin fırça kenarında kuvvetli pozitivite gözlenirken, villusların bazal bölge epitelinde reaksiyon gözlenmedi (Şekil 3.105, 3.106, 3.107, 3.108). Yirmi birinci günde, villusların apeks ve lateral yüz epiteli fırça kenarında kuvvetli, bazal bölge epitelindeyse zayıf pozitif reaksiyon tespit edildi. Kript epitelinde ise ALP aktivitesine rastlanmadı (Şekil 3.109, 3.110, 3.111, 3.112). Kuluçkanın 18, 20 ve 21. günlerinde, ALP reaksiyonu fırça kenarla sınırlı kalmadığı, enterositlerin apikal sitoplazmasının da güçlü ALP reaksiyonu verdiği dikkati çekti.

Kuluçkanın 18., 20. ve 21. günlerinde fırça kenarda gözlenen ALP reaksiyonunun şiddeti, nispi ALP aktivitesi belirlenerek değerlendirildi. Nispi ALP aktivitesi, ALP(+) alanın ölçülen doku alanına oranlanmasıyla [(ALP(+) alan/ölçülen alan)X100] hesaplandı. Elde edilen veriler, her iki ırkın ısı stresi gruplarının incelenen ince bağırsak bölümlerindeki nispi ALP aktivitesinin, kontrol grubundan önemli derecede (P<0,05) düşük olduğunu ortaya koydu (Çizelge 3.14).

Çizelge 3. 14. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen nisbi ALP reaksiyonu yoğunlukları (%).

		Gruplar n=5			
Kuluçka Dönemleri	**İnce bağırsak bölümleri**	**Hybro**		**Ross 308**	
		Kontrol	**Isı Stresi**	**Kontrol**	**Isı Stresi**
18. gün X±SE	**Duodenum**	1,52±0,152[a]	0,52±0,021[b]	1,10±0,159[a]	0,53±0,024[b]
	Jejunum	1,09±0,045[a]	0,48±0,017[b]	1,10±0,038[a]	0,49±0,028[b]
	İleum	0,87±0,047[a]	0,35±0,037[b]	0,89±0,040[a]	0,31±0,026[b]
20. gün X±SE	**Duodenum**	9,55±0,468[a]	7,31±0,491[b]	9,44±0,444[a]	6,90±0,246[b]
	Jejunum	10,16±0,450[a]	5,94±0,242[b]	9,54±0,151[a]	5,67±0,386[b]
	İleum	5,30±0,333[ab]	4,56±0,324[b]	5,69±0,307[a]	4,33±0,355[b]
21. gün X±SE	**Duodenum**	11,42±0,416[a]	8,05±0,302[b]	10,74±0,416[a]	7,64±0,203[b]
	Jejunum	11,14±0,786[a]	6,16±0,103[b]	10,00±0,814[a]	6,19±0,272[b]
	İleum	7,26±0,365[a]	5,89±0,316[b]	7,08±0,321[a]	5,68±0,201[b]

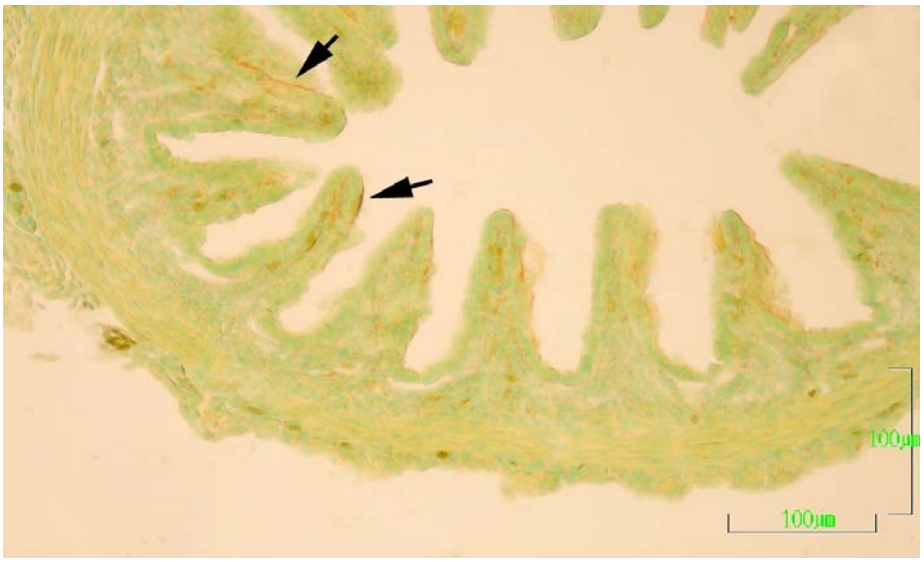
[a,b] Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



Şekil 3.98. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Bu dönemde jejunumda ALP aktivitesi gözlenmedi. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.99. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Bu dönemde duodenumda ALP aktivitesi gözlenmedi. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.100. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 15. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.101. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.102. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.103. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.104. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.105. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. ALP demonstrasyonu. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. Büyütme çizgisi: 100 µm.



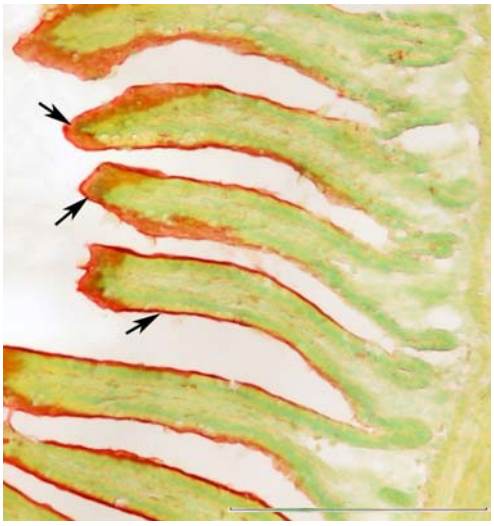
Şekil 3.106. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



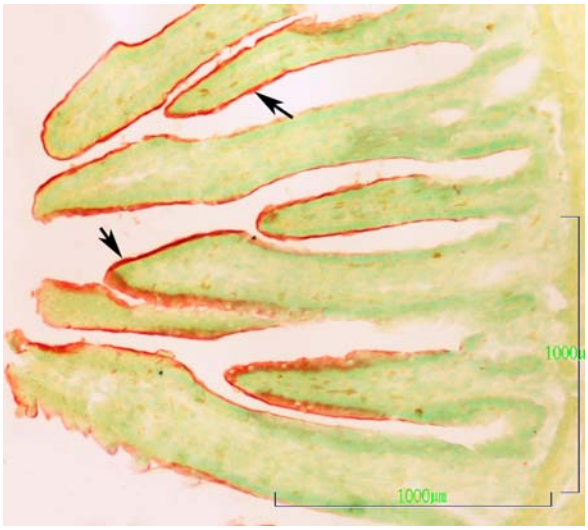
Şekil 3.107. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



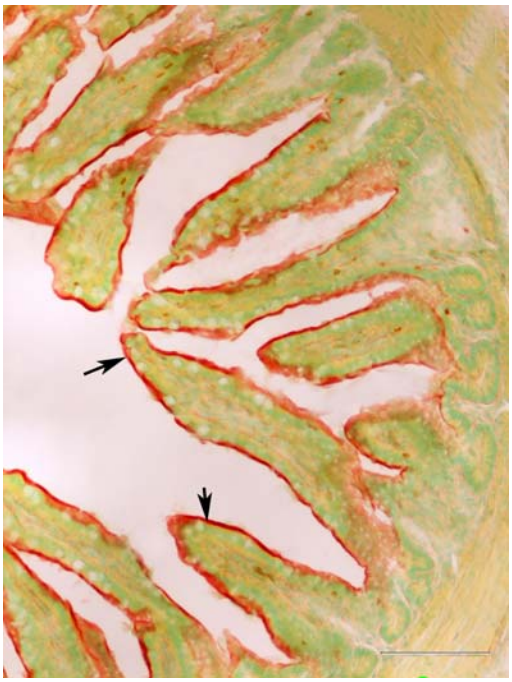
Şekil 3.108. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.109. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.110. Ross 308 ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.111. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum bir kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.112. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: ALP pozitivite bölgeleri. ALP demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.

3.9. Sükraz İzomaltaz Demonstrasyonu Bulguları

Enzimhistokimyasal boyama sonucunda kesitlerde SI aktivitesi enterositlerin fırça kenarında lokalize turuncu renkli reaksiyon olarak gözlendi.

Kuluçkanın 11. (Şekil 3.113), 13. (Şekil 3. 114), 15. ve 18. (Şekil 3.115) günlerinde ince bağırsağın her üç bölgesinde de enterositlerin fırça kenarında lokalize olan çok zayıf SI reaksiyonu tespit edildi. Yirminci günde, ince bağırsağın bütün bölgelerinde, villusların apeksi ve lateral yüz fırça kenarında lokalize olan enzim aktivitesi tespit edildi. Villusların bazalinde duodenumda pozitiviteye rastlanmadı (Şekil 3.116). Jejenum ve ileumda ise villusların bazalinde de zayıf bir pozitivite vardı (Şekil 3.117, 3.118). Jejunum ve ileumdaki aktivitenin duodenumdakinden daha güçlü olduğu dikkati çekti. Kuluçkanın 21. gününde enzim aktivitesine villus boyunca fırça kenarda rastlandı. Bu dönemde reaksiyon, 20. güne kıyasla daha güçlüydü (Şekil 3.119, 3.120) ve jejunum ile ileumdaki enzim aktivitesinin duodenumdakinden daha güçlü olduğu tespit edildi. Ayrıca duodenal kriptlerde reaksiyon görülmezken, jejunal ve ileal kriptlerde enzim aktivitesine rastlandı.

Kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde fırça kenarda gözlenen SI reaksiyonunun şiddeti, nispi SI aktivitesi belirlenerek değerlendirildi. Nispi SI aktivitesi, SI(+) alanın ölçülen doku alanına oranlanmasıyla [(SI(+) alan/ölçülen alan)X100] hesaplandı. Elde edilen veriler, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının SI enzim aktiviteleri arasında önemli fark olmadığını ortaya koydu (Çizelge 3.15).

Çizelge 3. 15. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen nispi SI reaksiyonu yoğunlukları (%).

	İnce	Gruplar n=5			
Kuluçka	Bağırsak	Hybro		Ross 308	
Dönemleri	Bölümleri	Kontrol	Isı stresi	Kontrol	Isı stresi
20. gün	**Duodenum**	7,29±0,631	7,05±0,315	7,10±0,383	7,06±0,552
X±SE	**Jejunum**	7,94±0,425	8,00±0,590	8,07±0,390	7,97±0,675
	İleum	7,62±0,286	7,56±0,306	7,51±0,309	7,55±0,290
21. gün	**Duodenum**	8,22±1,185	8,00±0,200	8,84±0,490	8,39±0,860
X±SE	**Jejunum**	8,73±0,640	8,55±0,450	9,03±0,757	8,43±0,467
	İleum	8,55±0,850	8,25±0,728	8,33±0,523	8,29±0,629

Kontrol ve ısı stresi gruplarının ortalama nispi SI reaksiyonu yoğunlukları arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildir.



Şekil 3.113. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 11. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.114. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 13. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



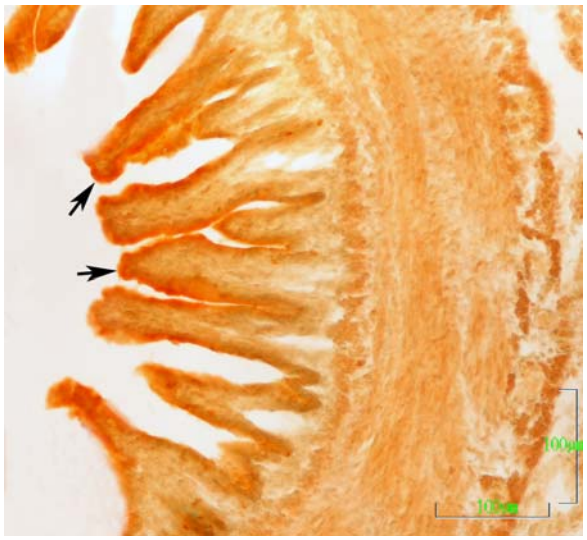
Şekil 3.115. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 18. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.116. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



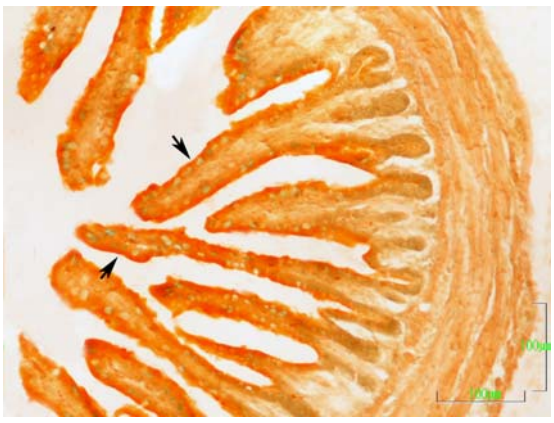
Şekil 3.117. Hybro ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki jejunum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.118. Hybro ırkından ısı stresi grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 20. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.119. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki duodenum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.120. Ross 308 ırkından kontrol grubuna ait bir embriyonun, kuluçkanın 21. günündeki ileum kesiti görülmektedir. Oklar: SI pozitivite bölgeleri. SI demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 100 µm.

4. TARTIŞMA

Broyler sektöründe, canlı ağırlık kazancının artırılması ve besleme döneminin kısaltılması amacıyla gerekli olan optimum bakım-besleme, sevk ve idare koşullarında son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bununla birlikte, kuluçka makinesi koşullarının kuluçka randımanı ve çıkış sonu gelişim üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler yetersizdir (De Smit ve ark 2006). Kanatlı embriyosu poikilotermik olduğundan, yumurta çevresi sıcaklığının hassas bir şekilde kontrolü, gelişen embriyo için hayati öneme sahiptir (Wilson 1991, French 1997, Van Brecht ve ark 2005). Kuluçka sıcaklığının olumsuz etkileri, diğer olumsuz faktörlerin etkilerinin ortaya çıkışında da belirleyici olduğundan, kuluçka randımanı ve çıkıştan sonraki gelişim üzerindeki etkisi en belirgin olan faktördür (İpek ve ark 2003). Bu nedenle yüksek çıkış kalitesi ve çıkış oranı sağlayan optimum sıcaklığın kuluçka boyunca sürdürülmesi, kuluçka başarısını artırmada çok önemli bir koşuldur (Nakage ve ark 2003).

Günümüzde kullanılan kuluçka makineleri, makine içi ortamın nem ve sıcaklığını dar sınırlar arasında kontrol ederek lineer ısıtma yapabilecek, güçlü bir hava sirkülasyonu sağlayacak ve çevirme işlemini hassas bir şekilde gerçekleştirecek tarzda imal edilmektedir. Bazı tipleriyse elektrik kesintilerine karşı yedek güç kaynaklarıyla ve oluşabilecek arızaları haber verecek alarm ve uzaktan kumanda sistemleriyle donatılmıştır. Çok pahalı sistemlerde piezo kristalli nemlendirici (nebulizer) ve elektromanyetik alanın etkilerinin en aza indirilmesi için su ceketli ısıtma uygulanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kuluçka makinesi (VGS, 108 Kap), sıcaklığı oldukça dar sınırlar arasında (Ayarlanan sıcaklık±0,25^{o}C) tutan ve oluşabilecek her hangi bir arızayı sesle uyaran bir yazılıma sahiptir. Isıtma, kapalı tip tek rezistansla, hava sirkülasyonu ise kesintisiz çalışan güçlü bir fanla yapılmaktadır. Nemlendirme sistemi ise piezo kristalli ultrasonik nebulizer sistemiyle gerçekleşmektedir. Hem manuel hem de otomatik çevirme yapılabilmektedir. Bu çalışmada; kuluçka sıcaklığı, kontrol grubunda kuluçka boyunca 37,8^{o}C'de tutulmuş, ısı stresi grubunda ise kuluçkanın 10. güne kadar 37,8^{o}C'de, 10. günden sonra 1 ^{o}C artırılarak kuluçka sonuna kadar 38,8^{o}C'de tutulmuştur. Çevirme sistemi iki saatte bir 90^{o} çevirme yapacak şekilde programlanmış ve yumurtalar, kuluçkanın 18. gününde makinenin çıkış bölümüne transfer edilmiştir.

Tıpkı su gibi hava da kuluçka makinesi içinde dirençle karşılaşmadan kolayca akabileceği yolu takip ettiğinden; bakımı iyi yapılmayan, kapıları iyi kapanmayan, çalışmayan fanı olan bir kuluçka makinesinin hava akımı paterni bozulur ve havalandırmada yetersizlik ortaya çıkar. Havalandırmadaki bu yetersizlik, yumurta etrafında yetersiz hava sirkülasyonuna yol açarak makine içinde soğuk ve sıcak bölgelerin (hot and cold spots) oluşumuna yol açar. Bu durum yumurtalardaki embriyoların bir örnek gelişimini bozar ve kuluçka randımanı yanında civciv kalitesini düşürür. Sıcak ve soğuk bölgelerin ortaya çıkışında, makine iç ortamının geometrik şekli yanında ısı algılayıcı sensörlerin az sayıda olması veya makine içinde kritik noktalara yerleştirilmemesi de rol oynamaktadır (Anom 2009c).

Yumurta etrafındaki hava, embriyonun metabolik hızını ve bunun sonucu olarak embriyonun ısı üretimini belirler (Van Brecht ve ark 2005). Bu yüzden yumurta içi sıcaklığın embriyonun maruz kaldığı sıcaklık olarak dikkate alınması önemlidir. Yumurta içi sıcaklığın yumurtaya ve içindeki embriyoya hasar vermeden ölçülmesi imkansız olduğundan, yumurta kabuğu sıcaklığının belirlenmesinin, embriyo sıcaklığı hakkında bilgi edinilebilecek en iyi non-invaziv yöntem olduğu bildirilmiştir (French 1997). Yumurtanın makine içindeki konumu ve kuluçka dönemine bağlı olarak, yumurta kabuğu sıcaklıkları arasında 4°C'nin üzerinde sapmalar tespit edilmiştir (Lourens 2001, Joseph ve ark 2006). Lourens'in (2001) sonuçları, makine içindeki hava akımı hızının düşük olduğu bölgelerdeki yumurta kabuğu sıcaklığının daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Kabuk sıcaklığı yüksek olan yumurtaların çıkış oranı ve kuluçka randımanı, bu yumurtalardan çıkan ölü embriyo sayısı, doğmasal kusurlu civciv sayısı ve düşük kaliteli civciv sayısının yüksek olması nedeniyle daha düşüktür. Lourens (2001) ticari makine sıcaklıklarının, kuluçkanın son haftasında 40°C'den daha yüksek sıcaklıklara ulaştığını bildirmiştir. Özellikle yumurtaların yerleştirildiği tavalar arasında hava akımı hızları düşmekte ve sorunlar buralardaki yumurtalarda ortaya çıkmaktadır. Tavuk ve hindi kuluçka makinelerinden elde edilen veriler, yumurta etrafındaki sıcaklıkla makinenin kontrol panelinde okunan sıcaklığın aynı olmaması, makine iç ortam sıcaklığıyla yumurta kabuk sıcaklığının aynı olmadığını göstermektedir (French 1997, Leksrisompong ve ark 2007). Leksrisompong ve ark (2007) kuluçkanın 14. gününde makine içi sıcaklığın 37,3°C olduğu halde, kabuk sıcaklığının 38,2°C'ye ulaşabildiğini ve aradaki farkın 1,6°C'ye çıkabileceğini bildirmişlerdir. Öznurlu ve ark (2009) da

ortalama yumurta kabuğu sıcaklığının kuluçka makinesi hava sıcaklığından daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da yumurtalar açılmadan önce yumurta kabuklarının sıcaklığı ölçüldü ve kontrol grubunda ortalama 39,04°C, ısı stresi grubunda ise ortalama 40,44°C olarak belirlendi.

Embriyo sıcaklığının, sadece döllü yumurtadan civciv çıkış oranı üzerinde değil aynı zamanda civcivlerin çıkış sonrası büyümeleri üzerindeki en önemli faktör olduğu kabul edilmektedir (Wilson 1991, Lourens ve ark 2005, Lourens ve ark 2007). Kanatlı embriyoları poikilotermik, yani vücut sıcaklığını kendi başına düzenleme kapasitesinden yoksun olduğundan, vücut sıcaklığı makine iç ortam sıcaklığınca belirlenir (Leksrisompong ve ark 2007). Embriyonun maruz kaldığı sıcaklık, kuluçka makinesi sıcaklığı, makine ve embriyo arasındaki ısı transferi ve embriyonun metabolik ısı üretimiyle belirlenmektedir (French 1997). Yumurtanın ısı transferi (termal kondüktans) ise çok daha komplekstir ve yumurta etrafındaki hava, ırk, sürü yaşı, kabuk porozitesi, yüzey alanı/hacim oranı gibi yumurta karakteristikleri, nem oranı, hava akış hızı ve makinenin havalandırma kapasitesi gibi faktörlerce belirlenir (Van Brecht 2005).

Kuluçkanın ilk yarısı olan 1-10,5'cu günler arasında embriyoda organların şekillenmesi tamamlanır. Bu dönemde embriyoda metabolik ısı üretimi düşük olduğundan, ısı transferi makine içi ortamdan yumurtaya doğrudur. Kuluçkanın 10,5-21. günleri arasındaki ikinci yarıdaysa, embriyonun metabolik ısı üretimi artarken O_2 tüketimi ve CO_2 üretimi artar (Smit ve ark 2008). Bu nedenle, büyük kapasiteli ve çok katlı kuluçka makinelerinde kuluçkanın ilk yarısında 37°C'den düşük kabuk sıcaklığı olan yumurtalar bulunabileceği gibi, tek katlı ve çok katlı makinelerde kuluçkanın ikinci yarısında 38°C'den yüksek kabuk sıcaklığı olan yumurtalara rastlanmaktadır (Lourens 2001, Lourens ve ark 2005, Joseph ve ark 2006, Lourens ve ark 2007). Ticari kuluçka makinelerinde ayarlanan sıcaklığın 2°C üzerinde yumurta sıcaklığı ölçüldüğü bildirilmiştir (Hulet ve ark 2007). Sonuç olarak, kuluçka makinelerinde sıcaklık dağılımında üniformite sağlanması oldukça zor olduğundan, çoğu makinede sıcak ve soğuk bölgelerin bulunması kaçınılmazdır. Bu yüzden, kuluçka makinesindeki yumurtaların tamamının yumurta sıcaklığı, kuluçkanın dönemine bağlı olarak, makinenin sıcaklık kontrol sistemince belirlenen sıcaklık değeriyle aynı olmamakta ve makine içinde farklı sıcaklığa sahip yumurtalar

bulunabilmektedir. Bu nedenle, kuluçka makinelerinde metabolik ısı üretim artışı olan dönemde havalandırmayı güçlendiren sistemlerin bulunması gerektiği vurgulanmıştır (Hulet ve ark 2007).

Düşük yada yüksek kuluçka sıcaklığının etkileri; optimum sıcaklıktan sapma derecesi, kuluçka dönemi ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişmektedir. Yüksek kuluçka sıcaklığı kısa süreli (≤3 saat) uygulandığında civcivlerin termoregülasyon sistemlerinin uyarıldığı, halbuki uzun süreli (≥1 hafta) maruziyette beyin lezyonlarının oluştuğu, göbeğin kapanmasının geciktiği ve civciv kalitesinin düştüğü gözlenmiştir (Yahav ve ark 2004). Yüksek sıcaklığa uzun süre maruziyet aynı zamanda, malformasyonlara neden olmakta, malpozisyon oranını artırmakta ve çıkış gücünü düşürmektedir (Collin ve ark 2005). Kuluçkanın ilk yarısı olan (0-10,5.'cu günler arası) erken dönemde bir tavuk embriyosunun maruz kalacağı hipertermi, doku ve hücrelerde hasarlara yol açarak organogenezisi olumsuz yönde etkilemektedir. Hücresel düzeyde ele alındığında, hipertermide oluşan protein fonksiyon kaybına, yüksek sıcaklıkta proteinlerin hatalı katlanması neticesinde oluşan peptid zinciri agregatlarının neden olduğu denatürasyonun yol açtığı düşünülmektedir. Protein fonksiyonundaki azalma, ökaryotik hücrede protein sentezini başlatıcı faktörlerle ribozomal proteinlerin fosforilasyon düzeyindeki değişiklikleri kapsayan anormal değişikliklerle birlikte ortaya çıktığında, hücrenin protein sentez mekanizması çökecektir (Bensaude ve ark 1990). İşte bu nedenledir ki, hipertermi embriyonik dönemde ortaya çıkarsa, hücre zarı ve zar proteinlerinin fonksiyonlarını hasara uğratarak hücrede yapısal hasara yol açar, DNA, RNA ve protein sentezi üzerinde köklü olumsuz etkiler yapar. Ortaya çıkan sonuç, kuluçka randımanının düşmesi ve gecikmiş veya hatalı ekstra embriyonik keselerle organ malformasyonlarının artışıdır. Peterka ve ark (1996), 24 saat gibi kısa bir süre dahi 41°C-42°C'de tutulan tavuk embriyolarında mortalitenin arttığını bildirmişlerdir.

Nilsen (1984), kuluçkanın ilk 3 gününde 41°C ya da 42°C'de inkübe edilen tavuk yumurtalarında, hem embriyo içi ve hem de embriyo dışı damarlarda anomalilerin geliştiğini bildirmiştir. Delphia ve Eliot (1965), kuluçka boyunca 40°C'de tutulan tavuk yumurtalarından çıkan civcivlerin %63'ünde kalp, karaciğer, taşlık ve ince bağırsak malformasyonları tespit etmişlerdir. Lourens ve ark (2005); en yüksek çıkış gücü ve en iyi çıkış sonrası performansını yumurta kabuğu sıcaklığının

sürekli 37,8^{o}C'de tutulduğu embriyolarda gözlemlemişler ve özellikle son hafta boyunca yüksek yumurta kabuk sıcaklığının (38,9^{o}C) geç dönem embriyonik ölümü artırdığı ve sonuç olarak çıkış gücünü düşürdüğünü bildirmişlerdir. Buna karşılık Joseph ve ark (2006), kuluçkanın ilk 10 günü düşük yumurta kabuğu sıcaklığının (36,6^{o}C); çıkış gücü, embriyo ağırlığı ve civciv kalitesini düşürdüğünü, ayrıca çıkış sonrası 6. haftaya kadar telafi edici bir gelişmenin olmadığı ve sonuçta karkas ve göğüs eti veriminin düştüğünü ifade etmişlerdir. Kuluçkanın ikinci dönemi olan büyüme evresi, doku ve organların büyümesi yanında fonksiyonel matürasyonun da gerçekleştiği dönemdir (Deeming, 2002). Bu dönemde aşırı sıcaklığa maruz kalan embriyoların yaşama kabiliyeti ve civciv kalitesi düşerken malpozisyonların oranı yükseldiğinden, kuluçka randımanı düşer (French 1997). Yumurtaların kuluçkanın 10. gününden itibaren yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığı bu çalışmada, her iki ırkta da ısı stresi grubunun mortaliteleri, kontrol grubundan yüksektir. Embriyonik ölümler geç embriyonik dönemde, özellikle HH skalasının 46. evresinde (kabuk altı ölümleri) yoğunlaşmaktadır. Yüksek kuluçka sıcaklığının geç dönem ölümlerine neden olduğu iyi bilinmektedir. Bu çalışmada, ölü embriyolarda makroskobik yapısal kusur ve gelişme geriliği gözlenmemiştir. Bununla birlikte, gaganın sivri uca doğru, hava kamarasının tersi yöne yönelmesi şeklindeki malpozisyona sıklıkla rastlanmıştır. Isı stresine maruz bırakılan Hybro ırkının mortalitesi Ross 308 ırkından daha yüksektir. Bu durum, Hybro ırkının yumurta kabuk porozitesinin düşük olmasına bağlı olabileceği gibi, bu ırkın gelişme hızının yüksek olmasına bağlı olabilir.

İri yumurtaların embriyo ağırlıkları da fazla olduğundan, embriyo ağırlığının yumurta ağırlığı içindeki oranı olan rölatif embriyo ağırlığının değerlendirilmesi embriyolojik çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir. Bu çalışmada da rölatif embriyo ve vitellüs kesesi ağırlıkları belirlenmiştir. Her iki ırkın yüksek sıcaklığa maruz bırakılan gruplarındaki embriyoların rölatif embriyo ağırlıkları kontrol grubununkinden önemli derecede düşük iken, vitellüs kesesi ağırlıkları kontrol grubundan daha yüksektir. Bu bulgular, yüksek sıcaklığın vitellüs kesesinden yararlanmayı engelleyerek embriyonik gelişmeyi baskıladığını göstermektedir ve Wineland ve ark (2006) ile Oviedo-Rondón ve ark (2008)'nın bulgularıyla uyumludur. Nitekim söz konusu araştırıcılar (Wineland ve ark 2006, Oviedo-Rondón ve ark 2008), oksijen yetmezliği döneminde yüksek kuluçka sıcaklığının broyler

embriyolarında canlı ağırlığı düşürdüğü ve yumurta sarısının kullanımının baskılandığını ifade etmişlerdir. Her iki ırkın ısı stresi gruplarında ortalama civciv çıkış ağırlıkları kontrol grubundan daha yüksektir. Bu durumun karın boşluğuna çekilen vitellüs kesesi içeriğinin ısı stresi gruplarında daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Leksrisompong ve ark (2007) Ross X Ross 308 etçi yumurtalarını, kuluçkanın 19-20. günlerinde 40°C sıcaklığa maruz bırakmışlar ve 38.2°C'de inkübe ettikleri kontrol grubunun değerleriyle karşılaştırdıklarında, vitellüs kesesi ve karaciğer ağırlıklarında artış oluştuğu halde; kursak, bezsel mide ve ince bağırsak ağırlıklarında düşüşler tespit etmişlerdir. Janke ve ark (2004) yüksek verimli broyler hatları (Ross 308 ve 508) ile bir yumurtacı ırkta (Lohmann White Leghorn) kuluçkanın ikinci yarısında yumurta sıcaklığını esas alarak yüksek kuluçka sıcaklığının etkisini değerlendirdikleri çalışmada oksijen kullanımını metabolik ısı üretimini hesaplamada kullanmışlardır. Yumurtacı civcivlerin 1 gün erken çıkmaları, bu ırkın daha yüksek metabolik hıza ve daha yüksek embriyonik gelişim hızına sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Christensen ve ark (2004a) kuluçkanın son 3 gününde 39°C'de inkübe ettikleri hindi embriyolarında bağırsak ağırlığında ve intestinal maltaz ile alkalen fosfataz aktivitelerinde azalma tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise (Christensen ve ark 2004b), yine aynı sıcaklıkta ve aynı dönemlerde inkübe edilen hindi embriyolarında kalp ağırlığı ve kalp enerji metabolizmasında azalma, benzeri koşullarda inkübe edilen hindi embriyolarında serum triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) konsantrasyonlarında düşüş gözlenmiştir (Christensen ve ark 2005).

Sunulan bu çalışmada, ince bağırsak ve villus gelişiminin daha önceki araştırıcıların tanımladığı tarzda gerçekleştiği tespit edildi (Grey 1972, Mamajiwalla ve ark 1992, Sabatakou ve ark 2003, Uni 2006). Kuluçkanın 10. gününden sonra kesintisiz olarak 38,8^{o}C'lik yüksek sıcaklığa maruz bırakılan her iki broyler ırkında ince bağırsağın duodenum, jejunum ve ileum bölümlerinin embriyonik gelişimi arasında ışık mikroskobik düzeyde tespit edilebilen histolojik değişiklik gözlenmedi ve villus boyu, villus genişliğiyle villus alanı parametreleri arasında önemli fark bulunmadı. Bununla birlikte, ısı stresi gruplarının çıkış gününde ortalama rölatif ince bağırsak ağırlıklarının kontrol grubundan düşük olduğu dikkati çekmiştir. Benzer

şekilde, Wineland ve ark (2006) broyler embriyolarında ve Christensen ve ark (2004a) da hindi embriyolarında, oksijen yetmezliği döneminde yüksek kuluçka sıcaklığının jejunum ağırlığını düşürdüğü buna karşılık uzunluğunda bir değişime neden olmadığını bildirmişlerdir.

Her hücre tipinin kendine özgü çoğalma proteini olan PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ekspresyon düzeyi, hücre siklusunun G1 fazının ortasından itibaren hızla artar, S fazı boyunca yüksek seviyesini korur ve G2/M fazında düşmeye başlar. Bu nedenle proliferatif hücrelerin tanınmasında bir marker olarak kullanılan PCNA (Uni ve ark 2000), bu çalışmada da ince bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyon aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Önceki araştırıcıların (Uni ve ark 1998b, Uni ve ark 2000) bulgularıyla uyumlu olarak kuluçkanın 20. gününde villus epitel hücrelerinin ve kuluçkanın 21. gününde hem villus epitel hücrelerinin hem de kript hücrelerinin büyük çoğunluğu proliferatif hücrelerdi. İncelenen kuluçka dönemlerinde, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının PCNA(+) hücre yoğunluklarıyla bu hücrelerin lokalizasyonları arasında önemli fark tespit edilmemesi nedeniyle yüksek kuluçka sıcaklığının, tavuk embriyosunun bağırsak epitel hücrelerinin proliferatif aktivitesi üzerinde önemli etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Kanatlılarda kuluçkadan çıkışta dahi sindirim sistemi, kompleks karbonhidratları sindirebilecek matürasyona sahiptir (Uni ve ark 2003a). Fırça kenar proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyonlarındaki değişiklikler, hayvanı çıkış sonrası karbonhidrat ve proteinden zengin beslenme dönemine hazırlar (Uni 2006). Besin makro moleküllerinin bağırsak lümenindeki sindirimini takiben; enterositlerin fırça kenar enzimleri olan disakkaridazlar, peptidaz ve fosfatazlarla parçalanması gereklidir (Semenza 1986, Chotinsky ve ark 2001). Fırça kenar enzimlerinden SI (sükraz-izomaltaz) ontojenitesi memeli ve kanatlı türlerinde farklıdır. Fare bağırsağında, düşük düzeydeki SI ekspresyonuna ilk olarak fötal gelişimin 16,5. gününde çok katlı endodermal epitel hücrelerinin tek katlı prizmatik epitele dönüşmesinden hemen sonra rastlanmıştır. SI'ın bu düşük düzeyli ekspresyonu postnatal dönemin 16-17. günlerine kadar sürer ve sütten kesilmeden hemen önce SI enziminin ekspresyonu hızla artar (Tung ve ark 1997). Sütle beslenme dönemi olmadığından, kanatlılarda kompleks karbonhidratların çıkış sonrasında hemen

sindirilebilmesi gereklidir (Sklan ve ark 2003, Uni ve ark 2003a) ve nedenle de civcivler, çıkış sonrasında ve hatta çıkıştan önce SI aktivitesiyle disakkaritleri hidrolize edebilme kapasitesine sahiptirler.

Bu çalışmada, kuluçkanın 11.,13.,15., ve 18. günlerinde ince bağırsağın her üç bölgesinin fırça kenarında lokalize olan çok zayıf SI reaksiyonu tespit edildi. Yirminci günde şiddetlenerek 21. günde daha yüksek seviyeye çıkan SI aktivitesinin, jejunum ile ileumda duodenumdan daha güçlü olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgular önceki araştırıcıların (Brown ve Moog 1967, Sklan ve ark 2003, Uni ve ark 2003a) bulgularıyla uyumludur ve kuluçkadan çıktığında civciv ince bağırsağının karbonhidratları sindirebilecek fonksiyonel potansiyele sahip olduğu görüşünü desteklemektedir. Brown ve Moog (1967), Leghorn civcivlerin ince bağırsağında kuluçkanın 9. gününde çok zayıf sükraz enzimi aktivitesi tespit etmişlerdir. Sklan ve ark (2003) ise, kuluçkanın 15. gününden itibaren ortaya çıkan SI mRNA ekspresyonunun 17. günden itibaren artarak 19. günde yüksek düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Uni ve ark (2003a), embriyonik gelişimin son periyodu boyunca ince bağırsak fırça kenar enzimlerinin aktivitesini incelemişler ve jejunumda, kuluçkanın 15. ve 17. günlerinde düşük düzeyde sükraz, maltaz ve aminopeptidaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Kuluçkanın 19. gününde başlayan bu enzim aktivitesi arıtışı çıkış gününde de sürmüştür. Chotinsky ve ark (2001), broyler civcivlerinden izole enterositlerde disakkaridaz aktivitesindeki değişimi incelemişler ve embriyonik gelişimin 18. gününde maltaz, laktaz ve trehalaz enzimlerinin spesifik aktivitelerinin yüksek düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Maltaz spesifik aktivesi çıkış sonrası 18. güne kadar tedricen düşerken, 7. günden sonra eser miktarda laktaz ve trehalaz aktivitelerine rastlanmıştır. Embriyonik gelişimin 18. gününde önemli oranda bulunan sükraz aktivitesi, çıkışta iki katına ulaşmış ve bu enzim aktivitesinde önemli bir düşüşün başladığı 35. güne kadar değişmeden kalmıştır. Bu çalışmada yüksek kuluçka sıcaklığının, her iki ırkın SI aktivitesi üzerinde önemli etkisinin bulunmadığını belirlenmiştir.

Uni ve ark (1998a), disakkaridaz aktivitesinin memelilerde de bildirildiği gibi kanatlı hayvanlarda da en düşük duodenumda en yüksek de jejunum ve ileumda olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da jejunum ve ileumda villus boyunca fırça

kenarda lokalize olan enzim aktivitesinin duodenumdakinden daha güçlü olduğu gözlendi.

Pankreatik enzimlerin embriyonik gelişim aşamasında dahi mevcut ve aktif oldukları bilinmektedir. Ayrıca, embriyonik bağırsakta fırça kenar enzimleri de eksprese edilmektedir. Bir fırça kenar enzimi olan intestinal ALP (alkalen fosfataz) aktivitesi, oldukça stabil olduğundan, ince bağırsak epitelinin fonksiyonel kondisyonunun bir göstergesi olarak da kabul edilir (Gu ve ark 2002). Daha önce yapılan çalışmalarda (Moog 1944, 1950), ALP aktivitesinin 9. günden 17. güne kadar duodenumda yavaş bir tempoyla başladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, her iki ırkın kontrol ve ısı stresi grubunda ince bağırsakların duodenum, jejunum ve ileum bölgelerinde kuluçkanın 13. gününden önce ALP pozitivitesi gözlenmedi ve zayıf pozitiviteye, önceki araştırıcılardan (Moog 1944, 1950) daha geç dönemde, kuluçkanın 15. gününde, duodenum ve jejunum epitelinde rastlandı. Pozitivite sonraki dönemlerde güçlenmiş ve kuluçkanın 18., 20. ve 21. günlerinde enterositlerin apikal sitoplazmasında da güçlü ALP reaksiyonu gözlenmiştir. Elde edilen sayısal veriler, yüksek kuluçka sıcaklığının, her iki ırkın ısı stresi gruplarındaki ALP aktivitesini önemli derecede baskıladığını ortaya koymaktadır. Bu bulgu, son dönemde maruz kalınan kuluçka sıcaklığının, ince bağırsağın fonksiyonel matürasyonu üzerinde olumsuz etkisi olduğunu bildiren araştırıcıların (Delphia ve Eliot 1965) görüşünü desteklemektedir.

Bağırsak içeriğinde bulunan mukus, çoğu bakterinin agregasyonuna yol açar ve bu sayede patojenik bakterilerin bağırsak epiteline tutunmasını engeller. Bu nedenle mukus katmanı, doğal savunma mekanizmasının önemli öğelerinden biridir (Allen ve ark 1993, Gu ve ark 2002). Civciv ince bağırsağında sadece asidik müsin içeren kadeh hücrelerine ilk kez kuluçkanın 18. gününde rastlanmış (Uni ve ark 2003b) ve aynı zamanda çıkış günü ile çıkış sonrası 7. güne kadar ince bağırsağın proksimal, orta ve distal segmentlerindeki asidik ve nötral müsin üreten kadeh hücrelerinin oranlarının eşit olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ince bağırsak epitelinde kadeh hücrelerine ilk kez kuluçkanın 13. gününde rastlandı. On sekizinci günde ise, büyük çoğunluğu, Uni ve ark'nın (2003b) bulgularına uygun biçimde sadece asidik müsin içeren hücrelerden oluşmaktaydı. Her iki ırkın kontrol ve ısı stresi gruplarının kadeh hücresi yoğunluklarının birbirine yakın olması, yüksek

kuluçka sıcaklığının, ince bağırsakların kadeh hücresi yoğunlukları üzerinde etkisinin olmadığını göstermektedir.

Gastrointestinal (GI) kanal organlarının duvarında bulunan entero-endokrin sistem hücreleri lokal etkili hormonlar olan sekretin, gastrin, kolesistokinin gibi peptid hormonları üretmektedirler. Enteoendokrin hücrelerin büyük çoğunluğu duodenum mukozasında lokalize olurlar (Tanyolaç 1999). Son yıllarda memelilerde somatostatin, PP, polipeptid YY, glukagon, sekretin, VIP, gastrin, kolesistokinin, nörotensin, bombesin, substans P, enkefalin, motilin benzeri peptidleri salgılayan hücre tipleri belirlenmiştir. Kanatlılarda kuluçkanın geç döneminde ortaya çıktıkları bilinmekte ve 16. günden önce, elektron mikroskopiyle çok az sayıda hücre tipi tanımlanabilmektedir (Rawdon 1984). Baxter-Grillo (1970), ince bağırsak epitelinde argentaffin granüllere sahip hücrelerin kuluçkanın 6. gününden itibaren ortaya çıktıklarını ve embriyo yaşının artmasıyla birlikte bu hücrelerin sayılarının arttığını bildirmiştir. Ayrıca on dokuzuncu günde, submukozada da çok sayıda argentaffin hücre tespit etmiştir. Penttilä (1968) ise tavuk embriyosu duodenumunda enterokromaffin hücrelere en erken kuluçkanın 14. gününde rastlamış ve gelişmenin ilerlemesiyle birlikte, bu hücrelerin sayısında da artış gözlemiştir. Bu çalışmada ise argirofil karakterdeki enteroendokrin hücreler ilk olarak kuluçkanın 13. gününde gözlendi. Argentaffin hücreler ise ilk olarak kuluçkanın 15. gününde duodenum ve jejunumda belirlenirken, 18. günde bağırsağın her üç bölgesinde de hem argirofil hem de argentaffin hücreler gözlenmiştir. Kuluçkanın 20. gününde, ince bağırsağın her üç bölgesinde de hem argirofil hem de argentaffin hücreler villus boyunca, intraepitelyal ve subepitelyal konumda tespit edilmiştir. Çıkış gününe kadar villus başına düşen enteroendokrin hücre sayısında önemli bir artış oluşmamış ve her iki ırkın kontrol ve ısı stresi grupları arasında önemli fark bulunmadığından yüksek kuluçka sıcaklığının argentaffin ve argirofil hücre yoğunlukları üzerinde önemli etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Apoptozis, multiselüler organizmaların embriyonik gelişiminde görevini tamamlayan ve istenmeyen hücrelerin selektif olarak ortadan kaldırılmasını sağlayan fizyolojik hücre ölümüdür (Samali ve Orrenius 1998) ve doku ve organı oluşturan hücrelerin yaşam siklusu boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Apoptozis sindirim kanalı organlarının gelişiminde de önemli rollere sahiptir. Isı

şoku, oksidatif stres, UV ve iyonize radyasyon gibi stres faktörlerinin bazı genlerin aktivasyonunu sağlayarak apoptozisi başlattıkları bilinmektedir (Gabai ve ark 1997, Samali ve Orrenius 1998). Bu çalışmada, apoptotik hücrelerin enzim immünohistokimyasal yöntemle belirlenmesi amacıyla TUNEL yöntemi kullanıldı. İlk kez Gavrieli ve ark (1992) tarafından tanımlanan TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP_biotin nick end labeling) yöntemi oldukça spesifik bir yöntem olup, sadece apoptotik hücre çekirdekleri boyanmaktadır. Yöntem, apoptotik hücreleri Tdt'nin 'polydeoxynucleotide' polimerinin sentezini takiben DNA'nın 3'-OH uçlarına spesifik olarak bağlanması prensibine göre boyadığından, mükemmel bir apoptozis indikatörüdür. Bu çalışmada kuluçkanın 11.,13.,15. ve 18. günlerinde apoptotik hücrelere bağırsak epitelinde çok az sayıda rastlanmıştır. Kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde ise, apoptotik hücrelere villusların apeksinde de rastlanmıştır. Apoptotik hücrelerin önemli bir kısmının villus apeksinden desquamasyona uğrayan hücreler olmaları dikkati çekmiştir. Yüksek kuluçka sıcaklığına maruz bırakılan hayvanların villus başına düşen apoptotik hücre sayılarında önemli fark tespit edilmemesi, ısı stresinin bu olay üzerinde önemli etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır.

İlk defa 1962 yılında Ferruccio Ritossa ve arkadaşları tarafından Drosophila melanogaster larvasında keşfedilen Hsp'ler, bütün canlı organizma hücreleri tarafından sentezlenebilen hücre koruyucu (sitoprotektif) proteinlerdir (Kiang ve Tsokos 1998, Kregel 2002, Pockley 2003, Kim ve ark 2006). Normal koşullarda düşük seviyede eksprese edilen bu proteinler, stres faktörlerinin etkisiyle oldukça güçlü eksprese edilirler. Hücreyi strese sokan faktörler, büyüme faktörleri ve hormonal uyarımlar gibi fizyolojik faktörler olabileceği gibi, ısı şoku, ağır metaller ve ultraviyole ışınları gibi çevresel faktörler ya da enflamasyon, otoimmün reaksiyonlar ve viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar gibi patolojik koşullar olabilir (Molle ve ark 2002). Hsp'lerin embriyonik gelişimde eksprese edildikleri belirlenmiş ve bu durumun strese karşı korunmada yararlı olabileceği bildirilmiştir. Zira Hsp'ler ve özellikle Hsp70, embriyogeneziste yeni sentezlenen proteinlere bağlanarak ve bunların hatalı katlanmalarını önleyerek fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimde önemli bir rol oynamaktadır (Leandro ve ark 2004). Nitekim sığır embriyolarında Hsp70 inhibisyonu hücre ölümüne neden olarak blastosist gelişiminde gerilemeye yol açmaktadır (Matwee ve ark 2001). Hsp ekspresyonu

artışı rat, sığır ve domuz embriyolarında da gözlenmiştir (Mirkes 1987, Kojima ve ark 1996, Matwee ve ark 2001). Mirkes ve ark (1991), rat embriyolarında Hsp ekspresyonunun embriyonik gelişim safhasına bağlı olarak değiştiğini ileri sürmüşlerdir.

Normal şartlarda Hsp70, yeni sentezlenen polipeptidlerin katlanmalarına, multiprotein komplekslerinin agregasyonuna ve hücresel membranlardan geçişlerine yardım eden ATP bağımlı moleküler şaperonlardır. Bu proteinlerden Hsp70 ekspresyonundaki artış, stres varlığını gösteren klasik bir bulgudur. Zira bu protein, hücrede konsantrasyonu artan denatüre durumdaki proteinlerin ortadan kaldırılmasına yardım ederek (Garrido ve ark 2001), çok sayıda stres ajanına karşı hücresel yanıtta esas rolü oynar (Rivera ve ark 2005). Kanatlılar da diğer omurgalılarda olduğu gibi stres koşullarına Hsp ekspresyonuyla yanıt vermektedirler (Wang ve Edens 1994, Wang ve Edens 1998, Givisiez ve ark 1999, Liew ve ark 2003, Figueiredo ve ark 2007). Hsp'lerin hepsi de hücrelerde farklı lokalizasyona sahiptir ve her ne kadar bazıları çekirdekte de bulunursa da çoğu hücre sitoplazmasında (sitosol, mitokondriyon, endoplazmik retikulum) dağılmış haldedir (Craig ve ark 1994). Isı stresine yanıt çok kısa sürede ortaya çıkmaktadır. Normal sıcaklığın 3-5°C üzerindeki ortam sıcaklıklarında strese yanıt olarak Hsp sentezinde kısa süre içinde bir artış gözlenir (Locke ve Noble 1995). Broylerlerde Hsp90 ekspresyonunun, ısı stresinin 2. saatinde kalp, karaciğer ve böbrekte dalgalı bir seyirle artmaya başladığı, 3-5. saatte hafifçe düştüğü, 10 saat sonra tekrar yükseldiği ve artışın, stresin şiddeti ve maruz kalınan süreyle bağıntılı olduğu bilinmektedir (Lei ve ark 2009).

Tavuk embriyolarında da normal kuluçka şartlarında Hsp70 ekspresyonu gerçekleşmektedir (Leandro ve ark 2004). Nitekim, Bloom ve Muscarella (1999) tavuk embriyosunun blastoderm hücrelerinde, ısı şoku olmadan da yüksek düzeyde Hsp70, Hsc70 ve grp78 ekspresyonu belirlemişlerdir. Morales ve ark (1998) ise tavuk embriyolarında retinal nörogenezis sürecinde Hsc70'in eksprese edildiğini ileri sürmüşlerdir. Gabriel ve ark (2002), 4 günlük tavuk embriyolarında normal kuluçka sıcaklığında Hsp70 transkriptlerinin eksprese edildiklerini gözlemişler ve ekspresyonun, orta derecede akut ısı stresinde (41^{o}C) artış göstermediği halde, şiddetli akut ısı stresinde (44^{o}C) önemli oranda arttığını belirlemişleridir. Leandro ve

ark (2004), broyler embriyolarının Hsp70 ekspresyonunun yaşa ve dokuya bağlı olarak akut sıcak ve soğuk stresinden etkilendiğini, genç embriyoların yaşlı embriyolardan daha fazla Hsp70 sentezlediklerini bildirmişlerdir. Givisiez ve ark (2001) ise tavuk embriyolarına kuluçkanın 13. gününden itibaren kronik soğuk (35,8 ^{o}C) ve sıcak (38,8 ^{o}C) ısı stresi uygulamışlardır. Sonuçta organ ağırlıklarının kuluçka sıcaklığından etkilendiği, Hsp70 ekspresyonunun dokuya bağlı olarak değiştiğini ve çalışılan çoğu dokuda Hsp70 ekspresyonunun artışında soğuk stresinin daha etkili olduğunu gözlemişlerdir. Bu sonuçlar, embriyonik dokuların hücre ölümüne yol açabilecek stres şartlarına karşı hücre koruyucu mekanizmaları harekete geçirerek yanıt verebildiklerini göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan primer antikor (Hsp70 antibody, GTX25439), hem yapısal olarak eksprese edilen Hsc70 ve hem de ekspresyonu stresle indüklenen Hsp70 proteinlerine spesifik olarak bağlanmaktadır. Hsp70 immün reaktivitesi hücrelerin sitoplazmalarında tipik kahverengi renkli diaminobenzidine (DAB) özgü renk reaksiyonu halinde gözlendi. Diğer araştırıcıların bulgularıyla uyumlu olarak hem kontrol hem de ısı stresi gruplarında incelenen bütün dönemlerde Hsp70 ekspresyonu gözlendi. Ayrıca Hsp70 ekspresyonundaki embriyonik yaşa bağlı düşüş diğer araştırıcıların sonuçlarıyla uyumludur.

Farklı doku tipleri ısı stresine farklı şiddette yanıt vermektedir. Nitekim ısı stresine maruz kalan beyin, akciğer ve deride daha yüksek Hsp72 birikimi olduğu saptanmıştır. Nakai ve Morimoto (1993) dokular arasındaki farkların, doku tiplerinin ısı şoku faktörü (HSFs) düzeylerindeki farklara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da farklı kuluçka dönemlerinde epitel hücreleri, kas telleri ve bağ dokusu fibroblastlarının farklı şiddetlerde Hsp70 pozitivitesi gösterdiği ve kas dokusunda Hsp70 pozitivitesi en düşük düzeyde iken, endotel hücrelerinin pozitivitesinin oldukça güçlü olduğu dikkati çekmiştir. Kuluçkanın 11.,13.,15.,18., 20. ve 21. günlerinde her iki ırkın kontrol gruplarında, embriyonik yaşın ilerlemesiyle birlikte her üç bağırsak bölümündeki Hsp70 pozitivitesinde tedrici bir azalma dikkati çekmektedir. Isı stresi her iki ırkta da epitel dokusunda Hsp70 pozitivitesinde artışa neden olmakla birlikte, kuluçkanın 11., 13., 15. ve 18. günlerinde artış önemsizdir. Ancak, stres faktörlerinin en şiddetli olduğu kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde, ısı stresi gruplarında Hsp70'in daha güçlü pozitivite gösterdiği

dikkati çekmektedir. Nitekim Hsp ekspresyonundaki artış, organizmanın strese adaptasyon çabasının hücresel düzeydeki göstergesidir.

Kojima ve ark (1996), 6 günlük erken dönemde akut ısı stresine maruz bırakılan domuz embriyolarında in vivo ve in vitro gelişimin etkilenmediğini ve ne Hsp70 ne de Hsp90 ekspresyonunda artış meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar (Kojima ve ark 1996) bu durumu erken dönemde ısı stresine maruz bırakılan embriyolarda, mevcut Hsp70 rezervinin hücreleri termal stresten korumada yeterli olmasıyla ekspresyonun artışına gerek kalmadığı şeklinde açıklamışlardır. Bu çalışmada da incelenen ilk dönemlerde ısı stresi gruplarında Hsp70 sentezinde önemli bir artışın olmaması, bu dönemde hücrelerin termal stresten korunmada yeterli olan Hsp70 rezervine sahip olmalarıyla açıklanabilir.

Her ne kadar strese karşı hücresel yanıtta Hsp70 indüksiyonu hücreyi koruyucu bir faktör olsa da, stresle karşılaşıldığında hücrenin öncelikle bu proteinin sentezini tercih etmesi, embriyonik gelişme geriliği veya gelişim bozukluğuyla sonuçlanabilir (Rivera ve ark 2005). Nitekim kuluçka sürecindeki ısı stresinin civcivlerin çıkış ağırlığı ve organ ağırlıklarını düşürdüğü, çıkış sonrası gelişimi inhibe ettiği bildirilmiştir (Christensen ve ark 2004a, Wineland ve ark 2006, Christensen ve ark 2007, Oviedo-Rondón ve ark 2008). Bu çalışmada da ısı stresi grubunda embriyo ağırlığı ve çıkış günü ince bağırsak ağırlığı kontrol grubuna kıyasla önemli oranda düşük bulunmuştur. Ayrıca kuluçkanın 18., 20. ve 21. günlerinde, her iki ırkın ısı stresi gruplarının ince bağırsağın fonksiyonel matürasyonunun bir göstergesi olan ALP aktivitesindeki düşüş de yukarıdaki araştırıcıların bulgularıyla açıklanabilir.

Son yıllardaki çalışmalar, apoptozisin sadece yaşlanan hücreler ve hızla gelişen dokularda geçekleşmediği aynı zamanda hücresel stres yanıtının da bir parçası olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim Tanaka ve ark (1996), bir stres reaktantı olan AMP içeren kültür ortamında ince bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyonunun önemli oranda azaldığını buna karşın apoptozisin arttığını bildirmişlerdir. Öte yandan akut hipertermi, rat embriyosunun farklı bölgelerinde gereksiz hücre ölümlerine yol açmak ve hücre proliferasyonunu engellemek suretiyle doğmasal kusurlara neden olabilmektedir (Breen ve ark 1999). Bununla birlikte, Hsp70'in ısı stresinin tetiklediği apoptozisi farklı mekanizmalarla inhibe ettiği ile

ilgili de çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Mosser ve ark (1997), Hsp70'in SAPK/JNK sinyal yolağına engel olmak ve kaspaz proteolitik kaskad yolunu bloke etmek suretiyle ısı stresinin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir. Sachidhanandam ve ark (2003) ise Hsp indüktörü olarak bilinen Herbimisin A verilen ratların karaciğerinde ortaya çıkan aşırı Hsp70 ekspresyonunun, ısı stresinin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Hsp70'in hücrenin yüksek sıcaklığın etkilerinden korunmasını sağladığı ve termotolerans gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda Hsp70'in hücreleri korumadaki bu yeteneğinin apoptozis inhibisyonunun bir sonucu olduğu bildirilmektedir (Li ve ark 2000).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kuluçka boyunca kuluçka makinesi içi sıcaklığının optimum seviyelerde tutulması kuluçkanın başarısı bakımından oldukça önemlidir. Kuluçka sıcaklığı aynı zamanda, civcivlerin çıkıştan sonraki yaşama kabiliyeti ve gelişme performanslarını da etkilemektedir. Her ne kadar günümüzün modern kuluçka makineleri, iç sıcaklığın çok iyi bir şekilde kontrol edilebileceği ve hava sirkülasyonu optimum düzeyde olacak şekilde dizayn edilmekteyse de, sıcaklık dağılımının kontrolü oldukça zor olduğundan, makine içinde sıcak ve soğuk bölgelerin (hot/cold spots) oluşması kaçınılmazdır. Bugüne kadar yüksek sıcaklığın civciv kalitesi, performans ve diğer fizyolojik sistemler üzerindeki etkileri üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda kuluçka makinesi iç sıcaklığı dikkate alınmıştır. Makinenin bazı bölgelerindeki yumurta sıcaklığının makine içi sıcaklığından farklı olması nedeniyle, kuluçkada yumurta sıcaklığının esas alınması ve makine içi sıcaklık dağılımıyla hava sirkülasyonunun buna göre ayarlanması, sıcak bölgelerin denetlenerek gerekli önlemlerin alınması açısından hayati öneme sahiptir.

Ayrıca kuluçkanın son dönemine doğru embriyonun büyümesiyle artan metabolik faaliyetler sonucu önemli miktarda ısı açığa çıktığından, bu dönemde makine içi sıcaklık dağılımı ve hava sirkülasyonunun daha hassas bir şekilde kontrolü gerekmektedir.

Bu çalışmada kuluçkanın 10. gününden itibaren uygulanan yüksek kuluçka sıcaklığının (38,8^{o}C) embriyonik ölüm oranını artırdığı ve embriyo canlı ağırlığında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, kuluçka boyunca sıcaklığın dikkatli bir şekilde kontrolünün önemini vurgulamaktadır. Gerek mortalitenin artması, gerekse canlı ağırlık düşüşü broyler üretiminde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle, canlı ağırlığın artırılmasına yönelik çalışmalar sadece yedirme dönemindeki bakım ve idare ile sınırlı kalmayıp, performansı etkileyen kuluçka faktörlerinin etkilerinin de belirlenerek gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

Etçi civcivlerin besleme dönemi oldukça kısa olduğundan, kuluçka döneminde ince bağırsaklarının embriyonik gelişimi ve fonksiyonel olgunlaşmasının olumsuz biçimde etkilenmemesi gerekir. Bu çalışmada, ülkemizde yetiştiriciliği

yapılan iki broyler ırkının ince bağırsaklarının embriyonik gelişimi ve fonksiyonel olgunlaşmasının kuluçka dönemindeki ısı stresinden etkilenme dereceleri belirlenmiştir. Gruplar arasında ince bağırsağın embriyonik gelişimi ve bazı villus parametereleri arasında önemli fark tespit edilmedi. Ayrıca grupların kadeh hücreleri ve enteroendokrin hücrelerin incelenen parametreleri arasında fark gözlenmedi. Bununla birlikte, bir enterosit matürasyon belirleyicisi olan ALP enzimi aktivitesinin, her iki ırkın ısı stresi gruplarında kontrol gruplarından önemli derecede düşük olduğu dikkati çekti. Sunulan bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan ısı stresinin ince bağırsak morfolojisi üzerinde ışık mikroskobik düzeyde gözlenebilen bir etkisi olmamakla birlikte, bağırsakların fonksiyonel matürasyonunu geciktirdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kuluçka sıcaklığının iki ırk üzerine etkisi küçük farklılıkların olmasına rağmen benzerdi.

İncelenen bütün dönemlerde hem kontrol hem de ısı stresi gruplarında ince bağırsak dokusunda Hsp70 pozitivitesi tespit edildi. Embriyonik yaşın ilerlemesiyle birlikte Hsp70 pozitivitesinin azaldığı dikkati çekti. Kuluçkanın 20. ve 21. günlerinde, özellikle ısı stresi grubunun ince bağırsak epitel hücrelerinde Hsp70 pozitivitesi kontrol grubundan önemli derecede yüksekti. İntestinal mukozanın Hsp70 sentezleme yeteneği, strese karşı temel mukozal savunmanın bir parçası olabilir. Zira Hsp70'in, şaperon görevine ek olarak stresle indüklenen apoptotik mekanizmayı bloke ederek sitoprotektif etki gösterdiği de düşünülmektedir. Bu nedenle, Hsp70 çeşitli patolojik koşulların neden olduğu hücre ve doku hasarına karşı korunmada en iyi bilinen endojen faktörlerden biridir. Herhangi bir toksik etkisi olmayan ve seçici olarak Hsp sentezine yol açan şaperon indükleyicilerin mukozal lezyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılması yeni bir terapötik yaklaşım olabilir.

Günümüzde kuluçka sıcaklığının gelişmeyi hızlandırıcı ya da yavaşlatıcı etkilerinin olduğu kesinlikle anlaşılmış olmakla birlikte, yaşam boyu performans üzerindeki etkisi henüz belirlenememiş ve anlaşılmamıştır. Bu nedenle kuluçka sırasındaki optimal yumurta sıcaklığının, embriyonik gelişme ve farklılaşma üzerindeki uzun süreli etkileri de dikkate alınarak belirlenmesine ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kuluçkada Deneysel Olarak Oluşturulan Isı Stresinin Broylerlerde İnce Bağırsağın Embriyonik Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Histokimyasal, İmmünohistokimyasal ve Histometrik Metotlarla Belirlenmesi

Tuğba ÖZAYDIN

Danışman
Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2009

Bu çalışmada, yüksek kuluçka sıcaklığının (38,8^{o}C) broylerlerde embriyonik ölüm oranı ve embriyo gelişimi üzerine etkileri ile ince bağırsağın embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, Hybro ırkı etçi damızlıklara ait 250 adet ve Ross 308 ırkı etçi damızlıklara ait 250 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Her ırka ait yumurtalar tartıldıktan sonra iki gruba ayrıldı ve kontrol grubuna ait yumurtalar kuluçka boyunca 37,8^{o}C'de kuluçka işlemine tabi tutulurken, ısı stresi grubuna ait yumurtalar kuluçkanın 10. gününe kadar 37,8^{o}C'de ve daha sonra kuluçkanın sonuna kadar 38,8^{o}C'de inkübe edildi. Açılmadan önce yumurtalar tartılarak açılma öncesi son yumurta ağırlıkları belirlendi. Kuluçkanın 11., 13., 15., 18., 20. ve 21. günlerinde her gruptan 10 adet canlı embriyo elde edilinceye kadar açılan yumurtalardan çıkan embriyolarla bunların vitellüs keseleri tartıldı ve Hamburger-Hamilton skalasına göre embriyonik gelişim evreleri belirlendi. Grupların nispi embriyo ve vitellüs kesesi ağırlıkları hesaplandı. Her grupta ölü embriyoların sayısı belirlenerek grupların ortalama mortaliteleri belirlendi. Elde edilen veriler; yüksek kuluçka sıcaklığının, embriyonik mortaliteyi artırdığı ve yumurta sarısı kullanımını azaltarak embriyo canlı ağırlığında ve ince bağırsak ağırlığında düşüşe neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmanın ince bağırsakların embriyonik gelişimi ve fonksiyonel olgunlaşmasının kuluçka dönemindeki ısı stresinden etkilenme derecesinin incelendiği bölümünde, embriyoların ince bağırsağının duodenum, jejunum ve ileum bölgelerinden doku örnekleri alındı. Uygun histolojik yöntemlerle işlenerek hazırlanan preparatlar dijital kameralı ışık mikroskobuyla incelendi ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Görüntüler, dijital görüntü analiz programıyla analiz edilerek incelenen parametrelerin sayısal verileri elde edildi. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi.

Hem kontrol ve hem de ısı stresi gruplarında erken embriyonik dönemde güçlü olan Hsp70 pozitivitesinde embriyonik yaşın ilerlemesiyle belirgin bir düşüş gözlendi. Her iki ırkın ısı stresi gruplarında epitel dokusundaki Hsp70 pozitivitesinin, incelenen dönemlerin tamamında kontrol grubundan daha güçlü olmakla birlikte, kuluçkanın 11., 13., 15. ve 18. günlerinde aradaki fark önemsizken, 20. ve 21. günlerinde Hsp70'in ısı stresi gruplarında daha güçlü eksprese edildiği belirlendi. Grupların hepsinde, çıkış gününe kadar apoptotik epitel hücre oranının çok düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca çıkışa yakın dönemde ve çıkış gününde hem villus hem de kript bölgesinde epitel

hücrelerinin büyük çoğunluğunun proliferatif hücreler oldukları belirlendi. Yüksek sıcaklık uygulamasının, bağırsak epitel hücrelerinde ne apoptozis ne de hücre proliferasyon hızı üzerinde belirgin etkisinin olmadığı tespit edildi. Fırça kenar enzimlerinden sükraz-izomaltaz enzim aktivitesi, ilk kez kuluçkanın 11. gününde enterositlerin fırça kenarında zayıf olarak gözlendi ve embriyonik yaşın ilerlemesiyle birlikte enzim pozitivitesinin de güçlendiği tespit edildi. Bununla birlikte yüksek kuluçka sıcaklığının sükraz-izomaltaz aktivitesi üzerinde önemli etkisi gözlenmedi.

Bağırsağın yapısal embriyonik gelişimi ve ölçülen villus parametreleri bakımından gruplar arasında önemli fark gözlenmedi. Ayrıca kadeh hücreleri ve enteroendokrin hücrelerin embriyonik dönemde ortaya çıkış zamanlarıyla kadeh hücrelerinin yoğunluğu bakımından da gruplar arasında fark yoktu. Ancak, bir enterosit matürasyon göstergesi olan ALP aktivitesinin, ısı stresi grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu belirlendi. Bulgulara dayanılarak, deneysel olarak oluşturulan ısı stresinin ince bağırsağın morfolojik yapısal gelişimini etkilemediği, ancak bağırsak ağırlığında düşüşe neden olduğu ve fonksiyonel matürasyonunu geciktirdiği sonucuna varıldı. Ayrıca yüksek kuluçka sıcaklığının incelenen iki broyler ırkı üzerindeki etkileri arasında farklar düşük düzeydeydi.

Anahtar Sözcükler: Broyler piliç; Hsp70 ekspresyonu; ince bağırsağın embriyonik gelişimi; yüksek kuluçka sıcaklığı.

7. SUMMARY

Determination of The Effects of Experimentally Induced Heat Stress on The Embryonic Development of Small Intestines of The Broiler by Histochemical, Immunohistochemical and Histometrical Methods.

The aim of the presence study was to determine the effects of high incubation temperature (38,8^{o}C) on the embryonic mortality and embryonic development of two boilers strains which were widely raised in Turkey and the effects on the embryonic development of small intestines were also investigated by means of histochemical and immunohistochemical methods.

In the experiment, 250 fertile eggs from each of Hybro and Ross 308 broiler strains were used. The eggs of each strain were weighed and divided into 2 groups as controls and heat-stressed groups. The control eggs were maintained under optimal conditions (37,8^{o}C) during the whole incubation period, whereas heat stress imposed eggs were maintained under 37,8^{o}C until the 10th day of incubation and then continuously exposed to high temperature (38,8^{o}C). At the 11th, 13th, 15th 18th, 20th and 21st days of incubation, some of the eggs were reweighed and opened until 10 living embryos were obtained from each group. The embryos and their yolk sacs were weighed, and then the developmental stages of embryos were determined according to the Hamburger-Hamilton scale. The numbers of dead embryos from each group were determined and the mean embryonic mortalities of the groups were calculated. Moreover, mean relative embryo weights and yolk sac weights of each group were calculated. Data indicated that high incubation temperature increased mean embryonic mortality, whereas depressed mean embryonic and intestinal weights and decreased yolk utilization of the heat-stressed groups.

In the experiment, the destruction degree of embryonic development and morphologically development and functional maturation of the small intestine of the animals were also investigated. Tissue samples were taken from living embryos in duodenum, jejunum and ileum regions of the small intestine. The specimens, which were prepared with appropriate histological techniques, were examined under the light microscope equipped with digital camera and the necessary digital images were recorded. By analyzing the images with an image analysis software, the numerical data of the parameters were obtained and analyzed statistically.

No significant difference was observed between the intestinal morphological development of the control and heat-stress groups of both strains, and measured parameters of intestinal villi. Furthermore, there was no difference among the groups from the point of appearance period of the goblet and enteroendocrine cells, and the distribution and density of goblet cells did not change with high temperature application. However, ALP activity, which is considered to be a marker of the enterocyte maturation, significantly declined in the heat-stressed group when comparised to the control group. As a result, it was concluded that the experimentally induced heat stress did not affect the morphological development of the small intestine. Nevertheless, heat stress delayed the maturation of small intestine. Moreover, the incubation temperature affected two strains in a quite similar manner except for minor differences.

Hsp70 was strongly expressed in both control and heat-stressed groups at all of the investigated embryonic periods, and the expression tended to decrease slightly with embryonic aging. In the intestinal epithelium, stronger Hsp70 positivity was observed in heat-stressed group than the control group at all of the observed periods, and the difference between groups was not significant at the 11th, 13th, 15th and 18th days of incubation. However, statistically an significant difference was observed on the days 20 and 21 of incubation. Apoptotic cell intensities in epithelial tissue of the groups were less in number before hatch, whereas most of the cryptic and villus epthelial cells were proliferating cells at the period of proior to hatch and on the day of hatch. The sucrase-isomaltase activity was weak at the brush border at the 11th day of the incubation and gradually increased with the embryonic age. Control and heat–stressed groups of both strains give similar sucrase-isomaltase reactivity and any differrence was not observed between the groups.

Key words: Broiler chicken; embryonic development of small intestine; high incubation temperature; Hsp70 expression.

8. KAYNAKLAR

1. Abastado JP. Apoptosis: Function and regulation of cell death. Res Immunol. 1996;147:443-456.

2. Aksoy T. Tavuk Yetiştiriciliği, 2. Basım, Ankara, Şahin Matbaası, 1994, 93:122,

3.Allan DJ and Harmon BV. The morphologic categorization of cell death induced by mild hyperthermia and comparison with death induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. Scan Electron Microsc. 1986;3:1121-1133.

4. Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaakso E. Gastroduodenal mucosal protection. Physiol Rev. 1993;73:823-857.

5. Ananthan J, Goldberg AL and Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science. 1986;232:522-524.

6. Anom. Incubation topics: Humidity in incubation. Available from http://www.brinsea.co. uk/uk/customerservice/ humidity.html. 2009a.

7. Anom. Hatching quality chicks. Available from http://msucares.com/pubs/publications/p1182.htm, 2009b.

8.Anom. COBB Hatchery Management Guide. Available from http://www.cobb-vantress.com/contactus/brochures/Hatchery_Guide_2008.pdf. 2009c.

9. Arrigo AP and Landry J. Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C, editors. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994, p.335-373.

10. Avunduk MC, Tavlı Ş, Yol S, Tavlı L, Yavuz A, Güngör S, Yılmaz O. Mide karsinomlarında Hücre proliferasyon belirleyicisi olarak PCNA, Ki-67 ve AgNOR kullanımı. Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası, 2000;53(1):11-15.

11. Bancroft JD, Cook HC, Stirling RW, Turner DR. Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application. Singapore: Longman Group UK Limited. 1994;135, 147, 206, 229.

12. Barišić K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. Acta Pharm. 2003;53:151-164.

13. Baxter-Grillo DL. Enzyme histochemistry and hormones of the developing gastrointestinal tract of the chick embryo. Histchemie. 1970;21:129-135.

14. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nature Cell Biol. 2000;2:469-475.

15. Beere HM. The stress of dying: The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J. Cell Sci. 2004;117:2641-2651.

16. Belaiche J, Delwaide J, Vivario M, Gast P, Louis E, Boniver J. Fundic argyrophil cell hyperplasia in atrophic gastritis: a search for a sensitive diagnostic method. Acta Gastroenterol Belg. 1993;56(1):11-17.

17. Benjamin IJ and Williams RS. Expression and function of stress proteins in the ischemic heart. In: Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C, editors. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p.533-552.

18. Bensaude O, Dubois PM, Van-Trung N and Morange M. 1990. Protein denaturation during heat-shock and related Stres. In: Schlesinger MJ, ed. Stress Proteins Induction and Function. Germeny: Springer-Verlag;1990. p. 89-99.

19. Binder C, Hiddemann W. Programmed cell death- many questions still to be answered. Ann Hematol. 1994;69:45-55.

20. Bloom SE and Muscarella DE. Expression of Hsp70 and Hsp25 stress response gene families in the early chicken embryo. PSA (Poultry Science Association) Annual Meeting, 90, 1999; Springdale, Arkansas.

21. Bosman FT, Visser BC and Oeveren J. Apoptosis:Pathophysiology of programmed cell death. Path Res Pract. 1996;192, 676-683.

22. Breen JG, Claggett TW, Kimmel GL and Kimmel CA. Heat shock during rat embryo development in vitro results in decreased mitosis and abundant cell death. Reprod Toxicol. 1999;13(1):31-39.

23. Brown K and Moog F. Invertase activity in the intestine of the developing chick. Biochim Biophys Acta. 1967;132:185-187.

24. Chang Y, Abe A and Shayman J. Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of αB-crystallin transcription. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:12275-12279.

25. Chotinsky D, Toncheva E and Profirov Y. Development of disaccharidase activity in the small intestine of broiler chickens. Br Poult Sci. 2001;42:389-393.

26. Christensen VL, Wineland MJ, Yildirum I, Ort DT and Mann KM. Incubator temperature and oxygen concentration at the plateau stage affects intestinal maturation of turkey embryos. Int J Poult Sci.2004a;3(6):378-385.

27. Christensen VL, Wineland MJ, Yıldrum I, Ort DT and Mann KM. Incubator temperature and oxygen concentration at the plateau stage affects cardiac health of turkey embryos. J Anim Vet Adv. 2004b;3:52-65.

28. Christensen VL, Wineland MJ, Yildirum I, Ort DT and Mann KM. Incubator temperature and oxygen concentration during the plateau stage in oxygen uptake affect turkey embryo plasma T4 and T3 concentrations. Int J Poult Sci. 2005;4(5): 268-273.

29. Christensen VL, Wineland MJ, Grimes JL, Oviedo EO, Mozdziak PS, Ort DT and Mann KM. Effect of incubator temperature and oxygen concentration at the plateau stage in oxygen consumption on turkey embryo muscle growth and development. Int J Poult Sci.2007;6:406-412.

30. Collin A, Picard M, Yahav S. The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. Anim Res. 2005;54:105-111.

31. Craig EA, Weissman JS and Harwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell, 1994;78: 365–372.

32. Culling CFA, Allison RT and Barr WT. Cellular Pathology Technique, Butterworts and Co Ltd, London, 1985.

33. Čvoro A, Korać A and Matić G. Intracellular localization of constitutive and inducible heat shock protein 70 in rat liver after in vivo heat stres. Mol Cell Biochem. 2004:265:27-35.

34. Çelik İ. Kanatlı üreme sistemi histolojisi ve embriyonik gelişimi. Öğrenci ders notları, 2008.

35. Çınar K. Koyunlarda, prenatal ve postnatal dönemlerde abomazumun histolojik gelişimi ve histokimyasal yapısı üzerine ışık mikroskopik çalışmalar. 1994. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

36. Dauça M, Bouziges F, Colin S, Kedinger M, Keller JM, Schilt J, Simon-Assmann P and Haffen K. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. Int J Dev Biol. 1990;34:205-218.

37. De Smit L, Bruggeman V, Tona JK, Debonne M, Onagbesan O, Arckens L, De Baerdemaeker J and Decuypere E. Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased CO^2 during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. Comp Biochem Physiol Part A 2006;145:166-175.

38. Deeming DC. 2002. Embryonic development and utilization of egg components. In: Deeming DC, ed. Avian Incubation Behavior, Environment, and Evolution. New York: Oxford University Press; 2002. p.43-53.

39. Delphia JM, Elliott J. The effect of high temperature incubation upon the myocardial glycogen in the chick embryo. J Embryol Exp Morphol. 1965;14:273-280.

40. Delwaide J**,** Latour P**,** Gast P**,** Louis E**,** Belaïche J. Effects of proglumide and enprostil on omeprazole-induced fundic endocrine cell hyperplasia in rats. Gastroenterol Clin Biol. 1993, 17:792-796.

41. Dyson JE, Simmons DM, Daniel J, McLaughlin JM, Quirke P and Bird CC. Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. Cell Tissue Kinet. 1986;19:311-324.

42. Eastman A. Apoptosis: A product of programmed and unprogrammed cell death. Toxicol Appl Pharmacol. 1993;121:160-164.

43. Elibol O and Brake J. Effect of egg turning angle and frequency during incubation on hatchability and incidence of unhatched broiler embryos with head in the small end of the egg. Poult Sci. 2006;85:1433-1437.

44. Erdoğan Bahadır B, Uzaslan Kunt E. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 2003;4:165-174.

45. Fan T, Han L, Cong R and Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin. 2005;37(11):719-727.

46. Figueiredo D, Getrler A, Cabella G, Decuypere E, Buyse J, Dridi S. Leptin downregulates heat shock protein -70 (HSP70) gene expression in chicken liver and hypothalamus. Cell Tissue Res, 2007;329:91-101.

47. Forstner JF, Oliver MG and Sylvester FA. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB and Guerrant RL, editors. Infections of the gastrointestinal Tract. New York: Raven Pres; 1995. p. 71-88.

48. French NA. Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. Poult Sci. 1997;76:124-133.

49. Fu XB, Zhang HB, Bao ED and Wang ZL. Advance in research on the HSP90 family. Animal Husbandry and Veterinary Medicine. 2004;36: 39–41.

50. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI and Sherman MY. Hsp70 prevents activation of stress kinases. JBiol Chem. 1997;272(29):18033-18037.

51. Gabriel JE, Mota AF, Boleli IC, Macari M and Coutinho LL. Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic Hsp70 gene expression. Growth Dev Aging. 2002;66:27-33.

52. Galea-Lauri J, Latchman DS and Katz DR. The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. Exp Cell Res. 1996;226: 243–254.

53. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L and Kroemer G. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2001;286:433-442.

54. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992;119:493-501.

55. Geyra A, Uni Z and Sklan D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. Poult Sci. 2001;80:776-782.

56. Givisiez PEN, Ferro JA, Ferro MIT, Kronka SN, Decuypere E and Macari M. Hepatic concentration of heat shock protein 70kD (Hsp70) in broiler subjected to different thermal treatments. Br Poult Sci. 1999;40:292-296.

57. Givisiez PEN, Silva MM, Mazzi CM, Ferro MIT, Ferro JA, Gonzales E and Macari M. Heat or cold chronic stress affects organ weights and Hsp70 levels in chicken embryos. Can J Anim Sci. 2001;81:83-87.

58. Gorman A, McGowan A and Cotter TG. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. FEBS Lett. 1997;404:27-33.

59. Gossrau R. Histochemical and biochemical investigation of α-glucosidases by means of 2-naphthyl-α-D-glucoside. Histochem Cell Biol. 1976;49(3):193-211.

60. Grey RD. Morphogenesis of intestinal villi. I. Scanning electron microscopy of the duodenal epithelium of the developing chick embryo. J Morphol. 1972;137:193-213.

61. Grimelius L. Silver stains demonstrating neuroendocrine cells. Biotech Histochem. 2004;79:1, 37-44.

62. Gu X, Li D and She R. Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet. Arch Anim Nutr. 2002;56:275-286.

63. Gustafsson B. The serotonin producing enterochromaffin cell, and effects of hyperserotoninemia on heart and bone. Norwegian University of Science and Technology Faculty of Medicine, Department of Cancer Research and Molecular Medicine Section for Gastroenterology and Section for Enterocrinology, Doctoral thesis, 2005.

64. Güçer Ş, Tınaztepe K. Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü. Hacettepe Tıp Dergisi. 2001;32(2):160-168.

65. Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 1951;88:49-92.

66. Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in tissue fate of granulocytes. Clin Sci. 1992;83:639-648.

67. Haupt S, Berger M, Goldberg Z and Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci. 2003;116(20):4077-4085.

68. Hendrick JP and Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. Annu Rev Biochem. 62: 349–384.

69. Hiramatsu H and Yasugi S. Molecular analysis of the determination of developmental fate in the small intestinal epithelium in the chicken embryo. Int J Dev Biol. 2004;48:1141-1148.

70. Hulet RM, Gladys G, Hill D, Meijerhof R and El-ShiekhT. Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on post hatch growth performance and carcass characteristics. Poult Sci. 2007;86:408–412.

71. İpek A, Sahan U and Yılmaz B. The effect of different incubation temperatures on the incubation performance of ostrich (Struthio camelus). Czech J Anim Sci. 2003;48(7):271-274.

72. Jaattela M. And Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Ann Med. 1992; 24: 249–258.

73. Janke O, Tzschentke B and Boerjan M. Comparative investigations of heat production and body temperature in embryos of modern chicken breeds. Avian Poult Biol Rev. 2004;15:191-196.

74. Joab I, Radanyi C. Renoir M, Buchou T, Catelli MG, Binart N, Mester J and Baulieu EE. Common non-hormone binding component in non transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. Nature. 1984;308: 850–856.

75. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl Cancer Inst. 2000;92(19):1564-1572.

76. Joseph NS, Lourens A and Moran ET. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. Poult Sci. 2006;85:932-938.

77. Kırkali G. Isı şok proteinleri: Hsp-27 ve böbrek hücreli karsinom ilişkisi. 2004.

78. Kiang JG and Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol Ther. 1998;80(2):183-201.

79. Kim E-K, Park JD, Shim S-Y, Kim H-S, Kim BI, Choi J-H, Kim JE. Effect of chronic hypoxia on proliferation, apoptosis, and HSP70 expression in Mouse bronchiolar epithelial cells. Physiol Res. 2006;55:405-411.

80. Klein SD and Brüne B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. Biochem J. 2002;362:635-641.

81. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress response and acquired thermotolerance. J Appl Physiol. 2002;92:2177-2186.

82. Kojima T, Udagawa K, Onishi A, Iwahashi H and Komatsu Y. Effect of heat stres on development in vitro and in vivo on synthesis of heat shock proteins in porcine embryos. Mol Reprod Dev. 1996;43:452-457.

83. Ku SK, Lee HS, Lee JH. Changes of gastrointestinal argyrophil endocrine cells in the osteoporotic SD rats induced by ovariectomy. J. Vet. Sci. 2004a;5(3):183-188.

84. Ku SK, Lee HS, Lee JH. A histochemical study of argentaffin endocrine cells in gastrointestinal tract of ovariectomized rats. Korean J Vet Res. 2004b;44:171–177.

85. Ku S, Seong S, Lee H, Lee J. Changes of gastrointestinal argyrophil endocrine cells in the COLO205 tumor-implanted Balb/c-nu/nu mice. J Vet Sci. 2005;6(4):267-271.

86. Landry J, Bernier D, Chretien P, Nicole LM, Tanguay RM and Marceau N. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. Cancer Res. 1982;42:2457-2461.

87. Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E and Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. J Cell Biol. 1989;109:7-15.

88. Leandro NSM, Gonzales E, Ferro JA, Ferro MIT, Givisiez PEN and Macari M. Expression of heat shock protein in broiler embryo tissues after acute cold or heat stress. Mol Reprod Dev. 2004;67:172-177.

89. Lee WC, Lin K.Y, Chen CM, Chen, ZT, Liu HJ and Lai YK. Induction of heat-shock response and alteration of protein phosphorylation by a novel topoisomerase II inhibitor, with angulatin A, in 9L rat brain tumor cells. J Cell Physiol. 1991;149: 66–76.

90. Lei L, Yu J, Bao E. Expression of heat shock protein 90 (Hsp90) and transcription of its corresponding mRNA in broilers exposed to high temperature. Br Poult Sci. 2009;50(4):504-511.

91. Leksrisompong N, Romero-Sanchez H, Plumstead PW, Brannan KE and Brake J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. Poult. Sci. 2007;86:2685–2691.

92. Lennon SV, Martin SJ and Cotter TC. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumoar cell lines by widely diverging stimuli. Cell Prolif. 1991;24(2):203-214.

93. Li GC and Werb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 1982;79:3218-3222.

94. Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen L and Lee WM. Thermal responce of rat fibroblasts stably transfected with human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:1681-1685.

95. Li C, Lee J, Ko Y, Kim J and Seo J. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. J Biol Chem. 2000;275(33):25665-25671.

96. Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM and Lusis AJ. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. J Clin Invest. 1994;94: 877–884.

97. Liew PK, Zulkifli I, Hair-Bejo M, Omar AR, Israf DA. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious Bursal Disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stres. Poult Sci. 2003;82:1879-1885.

98. Lindquist S and Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22:631–677.

99. Lindquist S and Petersen R. Selective translation and degradation of heat-shock messenger RNAs in Drosophila. Enzyme. 1990;44:147–166.

100. Locke M and Noble EG. Stress proteins: the exercise response. Can J Appl Physiol. 1995;20:155–167.

101. Lojda Z, Grossrau R, Schibler TH**.** Enzyme histochemistry. Springer-Verlag,Berlin, 1979, 59-70.

102. Lourens A. The importance of air velocity in incubation. World Poult. 2001;17(3):29-30.

103. Lourens A, van den Brand H, Meijerhof R and Kemp B. Effect of eggshell temperature during incubation on embriyo development, hatchability, and posthatch development. Poult Sci. 2005;84:914-920.

104. Lourens A, van den Brand H, Heetkamp MJW, Meijerhof R and Kemp B. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. Poult Sci. 2007;86:2194-2199.

105. Mamajiwalla SN, Fath KR and Burgess DR. Development of the chicken intestinal epithelium. Cur Top in Develop Biol.1992;26:123-143

106. Manev H, Kharlamov A, Armstrong DM. Photochemical brain injury in rats triggers DNA fragmentation, p53 and Hsp72. Neuroreport. 1994;5(18):2661-2664.

107. Marchaim U and Kulka RG. The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pankreas. Biochim Biophys Acta. 1967;146:553-559.

108. Marini M, Frabetti F, Musiani D and Franceschi C. Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. Int J Radiat Biol. 1996;70:337-350.

109. Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Bassur PK and King WA. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. Mol Hum Reprod. 2001;7(9):829-837.

110. Mestril R and Dillmann WH. Heat shock proteins and protection against myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol. 1995;27:45–52.

111. Mirkes PE. Hyperthermia-induced heat shock response and thermotolerance in postimplantation rat embryos. Dev Biol. 1987;119(1):115-122.

112. Mirkes PE, Grace RH, Little SA. Developmental regulation of heat shock protein synthesis and HSP 70 RNA accumulation during postimplantation rat embryogenesis. Teratology. 1991;44(1):77-89.

113. Miyazaki H, Kuwano K, Yoshida K, Maeyama T, Yoshimi M, Fujita M, Hagimoto N, Yoshida R, Nakanishi Y. The perforin mediated apoptotic pathway in lung injury and fibrosis. J Clin Pathol. 2004;57:1292-1298.

114. Molle WV, Wielockx B, Mahiev T, Takada M, Taniguchi T, Sekikawa K and Libert C. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. Immunity. 2002;16:685-695.

115. Moog F. Localization of alkaline and acid phosphatases in the early embryogenesis of the chick. Biol Bull. 1944;86:51-80.

116. Moog F. The functional differentiation of the small intestine. I. The accumulation of alkaline phosphatase in the duodenum of the chick. J Exp Zool. 1950;115:109-129.

117. Morales AV, Hadjiargyrov M, Díaz B, Hernández-Sánchez C, de Pablo F and de la Rosa EJ. Heat shock proteins in retinal neurogenesis: identification of the PM1 antigen as the chick Hsc70 and its expression in comparison to that of other chaperones. Eur J Neurosci. 1998;10:3237-3245.

118. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat shock response: regulation and function of heat shock proteins and molecular chaperones. Essays Biochem. 1997;32;17-29.

119. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response:cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. 1998;12:3788-3796.

120. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol. 1997;17(9):5317-5327.

121. Nakage ES, Cardozo JP, Pereira GT, Queiroz SA, Boleli IC. Effect of temperature on incubation period, embryonic mortality, hatch rate, egg water loss and partridge chick weight (Rhynchotus rufescens). Rev Bras Cienc Avic. 2003;5(2):131-135.

122. Nakai A, Morimoto RI. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor heat shock factor 3 suggests a new regulatory pathway. Mol Cell Biol. 1993;13:1983-1997.

123. Nilsen NO. Vascular abnormalities due to hyperthermia in chick embryos. Teratology. 1984;30: 237-51.

124. Noy Y and Sklan D. Yolk utilization in the newly hatched poult. Br Poult Sci. 1998;39:446-451.

125. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA and Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. Science. 1993;259:1769-1771.

126. Ohyama H, Yamada T, Ohkawa A and Watanabe I. Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. Radiat Res. 1985;101:123-130.

127. Ohyama K, Farquharson C, Whitehead CC, Shapiro IM. Further observation on programmed cell death in the epiphyseal growth plate: comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. J Bone Miner Res. 1997;12(10):1647-56.

128. Oviedo-Rondón EO, Small J, Wineland MJ, Christensen VL, Mozdziak PS, Koci MD, Funderburk SVL, Ort DT and Mann KM. Broiler embryo bone development is influenced by incubator temperature, oxygen concentration and eggshell conductance at the plateau stage in oxygen consumption. Br Poult Sci. 2008;49(6):666-676.

129. Öznurlu Y, Çelik İ, Telatar T, Sur E. Histochemical and histological evaluations on the effects of high incubation temperature on the embryonic development of thymus and bursa of fabricii of the broiler chickens. Br Poult Sci. 2009, In Press.

130. Penttilä A. Enterochromaffin cells in the chicken duodenum during prenatal development. Cell Tissue Res.1968;91(3):380-390.

131. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of thr immune responce. Lancet, 2003;362:469-476.

132. Pearigen P, Gwinn R and Simon RP. The effects in vivo of hypoxia on brain İnjury. Brain Res. 1996;725:184-191.

133. Peterka M, Peterkova R and Likovsky Z. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. Reprod Toxicol. 1996;10(4): 327-332.

134. Rawdon BB. Gastrointestinal hormones in birds: Morphological, chemical and developmental aspects. J Exp Zool. 1984;232(3):659-670.

135. Richard V, Kaeffer N and Thuillez C. Delayed protection of the ischemic heart-from pathophysiology to therapeutic applications. Fund Clin Pharmacol. 1996;10:409-415.

136. Rivera RE, Christensen VL, Edens FW, Wineland MJ. Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (Meleagris gallopavo). Comp Biochem Physiol-Part A. 2005;142:427-432.

137. Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mukozal protection. J Gastroenterol. Hepatol. 2000;15(Suppl):12-19.

138. Romero A, Gómez F, Villamayor F, Sacristán A, Ortiz JA. Study of the population of enterochromaffin-like cells in mouse gastric mucosa after long-term treatment with ebrotidine. Toxicol Pathol. 1996, 24(2):160-165.

139. Roy H. Heat shock and heat shock proteins. Biochem J. 1986;240:313–324.

140. Rudin CM and Thompson CB. Apoptosisi and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. Annu Rev Med. 1997;48:267-281.

141. Sabatakou O, Paraskevakou E, Tseleni-Balafouta S, Athanasiadis A and Fasseas K. The development of the chicken small intestine: a scanning electron microscopy study. J Submicrosc Cytol Pathol. 2003;35(3):323-330.

142. Sachidhanandam SB, Lu J, Low KSY, Moochhala SM. Herbimycin A attenuates apoptosis during heat stres in rats. Eur J Pharmacol. 2003;474:121-128.

143. Samali A and Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. Cell Stress & Chaperones1998;3(4):228-236.

144. Sanders BM. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Crit Rev Toxicol. 1993;23: 49–75.

145. Sandstrom PA, Mannie MD and Buttke TM. İnhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. J Leukocyte Biol. 1994;55:221-226.

146. Scanziani E, Crippa L, Giusti AM, Gualtieri M, Mandelli G. Argyrophil cells in gastrointestinal epithelial tumours of the dog. J Comp Pathol. 1993;108(4):405-409.

147. Schuler M and Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochem Soc Trans. 2001;29(6):684-688.

148. Schwartz LM and Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today. 1993;14(12):582-590.

149. Semenza G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane protein: glycosidases and peptidases of enterocytes and of renal tubuli. Ann Rev Cell Biol. 1986;2:255-313.

150. Sklan D. Development of the digestive tract of poultry. World's Poult Sci J. 2001;57:415-428.

151. Sklan D, Geyra A, Tako E, Gal-Gerber O, Uni Z. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. Br J Nutr. 2003;89:747-753.

152. Smirnov A, Sklan D and Uni Z. Musin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. J Nutr. 2004;134:736-742.

153. Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D and Uni Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. J Nutr. 2005;135:187-192.

154. Smit L, Bruggeman V, Debonne M, Tona JK, Kamers B, Everaert N, Witters A, Onagbesan O, Arckens L, De Baerdemaeker J and Decuypere E. The effect of nonventilation during early incubation on the embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. Poult. Sci. 2008;87: 551-560.

155. Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdoğan B. Meningiomlarda histopatolojik tanının flovsitometrik DNA analizi, PCNA ve Ki-67 ile korelasyonu. Türk Nöroşirurji Dergisi, 2002;12:48-53.

156. Tanaka M, Kaechoong L, Martinez-Augustin O, He Y, Sanderson IR and Walker WA. Exogenous Nucleotides alter the proliferation, differentiation and apoptosis of human small intestinal epithelium. J Nutr. 1996;126(2):424-433.

157. Tanyolaç A. Özel Histoloji, 3. baskı, Ankara:Yorum Basın Yayın Sanayi Şirketi, 1999, 93.

158. Tona K, Onagbesan O, De KetelaereB, Decuypere E and Bruggeman V. Effects of turning duration during incubation on corticosterone and thyroid hormone levels, gas pressures in air cell, chick Quality, and juvenile growth. Poult Sci. 2003;82:1974-1979.

159. Tung J, Markowitz AJ, Silberg DG and Traber PG. Developmental expression of SI is regulated in transgenic mice by an evolutionarily conserved promoter. Am J Physiol. 1997;273:G83,92.

160. Ulukaya E. Apoptozis ders notları, 2003. Available from http://biyokimya. uludağ. edu.tr/apoptozis_ ders_notu.pdf.

161. Uni Z, Ganot S and Sklan D. Posthatch development of mukosal function in the broiler small intestine. Poult Sci. 1998a;77:75-82.

162. Uni Z, Platin R, Sklan D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. J Comp Physiol B; 1998b:168:241-247.

163. Uni Z, Geyra A, Ben-Hur H and Sklan D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. Br Poult Sci. 2000;41:544-551.

164. Uni Z, Tako E, Gal-Garber O and Sklan D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. Poult Sci. 2003a;82:1747-1754.

165. Uni Z, Smirnov A and Sklan D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed Access to feed. Poult Sci. 2003b;82:320-327.

166. Uni Z. Early development of small intestinal function In: Perry GC, ed. Avian gut function in health and disease. Cambridge USA: CABI Publishing, 2006, p. 29-56.

167. Uzunoğlu N. Alkalen fosfataz enziminin fizikokimyasal özellikleri. T Klin J Med Sci, 1998;18:69-76.

168. Van Brecht A, Hens H, Lemaire L, Aerts JM, Degraeve P and Berckmans D. Quantification of the heat exchange of chicken eggs. Poult Sci. 2005;84:353-361.

169. Wang S, Edens FW. Hsp70 mRNA expression in heat-stressed chickens. Comp Biochem Physiol. 1994;107b:33-37.

170. Wang S, Edens FW. Heat conditioning induces heat shock proteins in broiler chickens and turkey poults. Poult Sci. 1998;77:1636-1645.

171. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev. 1992;72:1063–1081.

172. Wilson HR. Physiological requirement of the developing embryo: Temperature and turning. In: Tullett SG, ed. Avian Incubation. London, UK: Butterworth-Heinemann, 1991, p.145-146.

173. Wineland MW, Christensen VL, Yildrum I, Fairchild BD, Mann KM and Ort DT. Incubator temperature and oxygen consentration at the plateau stage in oxygen comsumption affects intestinal maturation of broiler chicks. Int J Poult Sci. 2006;5(3):229-240.

174. Wyllie AH and Duvall E. Cell injury and death. In: Mcgee JO'D, Isaacson PG, Wright NA editors. Oxford Textbook of Pathology. Oxford: Oxford University Press. 1992, p. 141-147.

175. Yahav S, Shamay A, Horev G, Bar-Ilan D, Genina O and Einat-Friedman M. Effect of acquisition of improved thermotolerance on the induction of heat shock proteins in broiler chickens. Poult Sci. 1997;76:1428-1434.

176. Yahav S, Collin A, Shinder D and Picard M. 2004. Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: Effects of timing and temperature. Poult Sci. 2004;83:1959–1963.

9. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini tamamladıktan sonra 1994 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1999 yılında mezun oldu. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Evlidir.