

## DOKU KÜLTÜRLERİNDE AFLATOKSİNİN ETKİSİ

Nalan Karademir\*\*

Effect of aflatoxin on tissue cultures

**Summary:** *The effects of aflatoxin B<sub>1</sub> at the dose levels of 0,25 µg/ml and 0,5 µg/ml were investigated on the fibroblasts and the epithelial cells in tissue cultures. Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) epithelial cultures and fibroblast cultures of 11-day old chick embryo were used in the study.*

*The results can be summarized as follows;*

1 *Rounded cells that tended to be vacuolated with enlarged cytoplasm and a slower rate of growth were observed in epithelial cells affected by aflatoxin.*

2 *In fibroblast cultures affected by aflatoxin, again a slower rate of cell growth as well as polygonal cytoplasm together with the formation of giant cells and vacuolization in the cytoplasm were detected.*

3 *The uniformity in both of these cultures began to disappear within 24 hours following the exposure to aflatoxin at a dose level of 0,25 µg/ml.*

4. *Nearly all of the cells in epithelial culture were observed to disappear substituted by necrotic and necrobiotic cell debris within 72 hours following the addition of aflatoxin at a dose level of 0,5 µg/ml.*

5. *The pathological findings in the chick embryo fibroblasts at the 24th and 48th hours after the addition of the toxin were appeared to be more evident than the findings noted concurrently in epithelial cultures.*

**Özet:** *Doku kültüründe fibroblast ve epitel hücreleri üzerine 0,25 µg/ml ve 0,5 µg/ml dozlarında aflatoksin B<sub>1</sub> uygulanmış ve meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Çalışmada Madin-Darby Bovine Kid-*

\* Bu çalışma, aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

\* Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ney (MDBK) epitel kültürü ve 11 günlük civciv embriyosu fibroblast kültürü kullanılmıştır.

*Elde Edilen Sonuçlara Göre:*

1. Aflatoksinli epitel kültürlerinde, geniş sitoplazmalı, vakuolleşme gösteren yuvarlaklaşmış hücreler ve üremede yavaşlama gözlenmiştir.

2. Aflatoksinli fibroblast kültürlerinde, hücre üremesinde azalma, poligonal sitoplazmalar ile dev hücre formasyonları ve sitoplazmada vakuolizasyon saptanmıştır.

3. 0,25 µg/ml dozunda 24. saatte her iki hücre kültüründe de üniformite kaybolmaya başlamıştır.

4. 0,5 µg/ml'lik doz uygulandığında epitel kültüründe 72. saat sonunda, hücrelerin tamamına yakın bir kısmının kaybolduğu, yerlerinde nekrotik ve nekrobiyotik hücre artıkları bıraktıkları gözlenmiştir.

5. Civciv embriyosu fibroblastları üzerine 24. ve 48. saatlerde toksin ilâvesi sonucu gözlenen bulguların aynı saatlerde epitel hücrelerinde saptanan bulgulardan daha şiddetli olarak geliştiği dikkati çekmiştir.

## Giriş

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, 250'den fazla mantar türünün mikotoksin oluşturduğunu göstermiştir. Bunlar arasında Veteriner Hekimlik yönünden önem taşıyanları aflatoksinler, trikotesenler, okratoksinler, T-2 toksini, zearalenone, rubratoksinler, patulin, sitrinin sterigmatosistin, penisillik asit, alternaryol, PR-toksin, kojik asit, sporidemsin, tenuazonik asit ve ergot alkaloidleridir (2, 16).

Aflatoksinler, çeşitli toksijenik mantarlar arasında yer alan ve başta *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, *Aspergillus flavus* var. *globus* ve *Aspergillus parasiticus* türleri olmak üzere, diğer bazı *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından sentezlenen, insan ve hayvanlarda ciddi toksikozislere (aflatoksikozis) neden olan toksik metabolizma ürünleridir (2, 3,30,36).

Aflatoksijenik mantarların üreyebilmesi ve toksin sentezleyebilmesi için bir substrat bağımlılığı sözkonusu olmadığı için her türlü yem ve gıda maddesi aflatoksinlerle kontamine olabilir. Aerobik koşullarda ortam rutubetinin % 15'ten yukarıda (tercihen % 70) ve ısı-

sının da 20-30-°C'ler arasında olduğu durumlarda hızla üreyerek aflatoksin sentezleyebilirler (2,10,14,36,39).

Birçok tahıl türü ve süt ürünleri toksijenik *Aspergillus flavus* türleri tarafından kontaminasyona oldukça duyarlıdırlar (2,3,6,24).

Aflatoksinler, metanol, dimetil sulfoksit (DMSO), kloroform, aseton ve propilen glikol'de erirler. Su ve petrol eterde erimezler (2,8).

Aflatoksinler, ultraviole ışığı altında gösterdikleri fluoresans özelliklerine göre mavi (blue) fluoresans veren B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>; yeşil (green) fluoresans veren G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> esas komponentleri yanısıra, hayvanların sütüyle dışarı çıkan süt toksinleri (milk toksin) olan M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> komponentlerini de kapsarlar. Bunlardan başka B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, P<sub>1</sub> ve Q<sub>1</sub> ve R<sub>0</sub> gibi diğer komponentleri de içerirler (10, 12, 23, 37, 39).

Aflatoksinler arasında en fazla toksik etkiye sahip olup invivo öldürücü olanı aflatoksin B<sub>1</sub>'dir. Aflatoksinlerin öldürücü etkileri şöyle sıralanabilir:

$$B_1 < G_1 < B_2 < G_2 \text{ (2, 26, 27, 28., 36, 37, 38).}$$

Aflatoksin ile kontamine olmuş gıda maddelerinin birçok hayvan türü için toksik ve karsinojenik olduğu bulunmuştur (6, 7, 18, 20, 36, 37, 40).

Toksikolojik araştırmalarda, etki mekanizmasının ve kimyasal toksisitenin şiddetinin saptanması için pekçok hücre kültürü sistemlerinden yararlanılmıştır. Özellikle Primer Fötal Dana Böbrek (FDB) ve Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) gibi standart hücre kültürleri çoğunlukta olmak üzere, ayrıca primer hepatosit kültürleri, insan akciğer hücreleri, embryo fibroblastları ve tavşan cornea hücreleri gibi daha birçok hücre dizilerinden faydalanılmıştır (4,13, 22,40).

İnsan ve hayvanlarda çok önemli toksikozise neden olması ve ülkemizde güncelliğini halen devam ettirmesi nedenleriyle aflatoksin B<sub>1</sub>'in doku kültüründe epitel hücreleri ve fibroblastlar üzerindeki etkisini değişik dozlarda ve değişik zamanlarda incelemek bu çalışmanın amacı olmuştur.

Toksisite sendromuyla ilgili elde edilen ilk rapor genç hindilerde bildirilmiştir. İngiltere'de 1960 yılı ilkbaharında 100.000 hindinin ölmesi üzerine yapılan çalışmalarda ölümlerin, Brezilya'dan getirilen fıstık küspelerinden ileri geldiği anlaşılmıştır (Turkey-X-disease) (1, 35).

Ergin insan karaciğer hücresi ve akciğer hücresi kültürlerinin aflatoksin B<sub>1</sub>'e karşı embryo karaciğer hücre kültürlerinden çok daha az duyarlı olduğu saptanmıştır (19). Bu bulgu, *invivo* denemelerde de genç hayvanlarda daha fazla duyarlılık şeklinde bildirilmiştir (20, 21, 25).

Yoneyama ve ark. (40), bu önemli gıda kontaminantı olan aflatoksin B<sub>1</sub>'in sitotoksitesini standart hücre kültürlerinde; MDBK hücrelerinde ve FDB hücrelerinde değerlendirdiklerinde; FDB kültürü, sitotoksik etki yönünden yaklaşık 4 kat daha duyarlı bulunmuştur. Testin 72. saatinde ise MDBK hücrelerinde olduğundan 10 misli daha duyarlı olmuştur.

Saf ve kristalize aflatoksin preparasyonlarının, kültüre edilmiş insan diploid ve heteroploid embriyonik akciğer hücrelerinde mitozu baskıladığı, DNA sentezini inhibe ettiği ve dev hücre formasyonuna sebep olduğu (9, 18, 19), yine *invitro* olarak DNA'yı engellediği ve *invivo* olarak ise aflatoksin B<sub>1</sub>'in rat karaciğer nüklear RNA'sı içine cytidine-H<sup>3</sup>'ün birleşmesini süratle engellediği ve nüklear RNA'nın DNA'ya oranının daha düşük olduğu; bunun sonucu olarak ta bu bileşiğin etki mekanizmasında, aflatoksin B<sub>1</sub>'in DNA'ya bağlanması en önemli etki olabileceği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar; nukleustaki RNA sentezinin bloke edildiğini öne sürmektedir (3,7, 32, 34).

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in aktivasyonu, tamamıyla 2,3-epoxide'in formasyonu (epoksidasyon) ile şekillenmekte olup, sonuçta bu bileşik karinojenik derivatif olarak gösterilmektedir (29).

Aflatoksin B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>'nin insan embryo karaciğer hücre kültürlerinde, aflatoksin B<sub>1</sub>'in ise ergin karaciğer hücre kültürleri, semicontinuous (yarı devamlı) diploid karaciğer hücre kültürü ve diploid akciğer hücre dizisi üzerine sitotoksitesini tayin edilmiş ve aflatoksin B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>'nin, aflatoksin B<sub>1</sub>'e göre insan embryo karaciğer hücrelerine oldukça daha az toksik etki gösterdiği bulunmuştur (33).

Juhasz ve Greczi (15) aflatoksinlerin determine edilmesinde doku kültürü inokulasyon tekniğinden yararlanmışlardır. Toksikite, buzağı böbrek monolayer kültüründeki hücre yıkımının derecesi ile değerlendirilmiştir. *Aspergillus flavus* ile enfekte olmuş yerfıstığı örneklerinin ekstraktları, buzağı böbrek epitel kültüründe önemli derecede sitotoksik etkili olmuştur. Bu hücrelerde, nukleus ve sitoplazmanın her ikisi de yıkılmıştır.

Yoneyama ve ark. (40), FDB ve standart MDBK hücrelerinin, aflatoksin B<sub>1</sub> içeren vasatla 24 saatlik muamele sonucunda, elektron mikroskopik incelemelerde, bu hücrelerde kromatinin hücre içinde yoğunlaştığını, sitoplazmadan nukleusun ayrıldığını, sitoplazmada vakuollerin şekillendiğini ve yüzey mikrovillusların yıkıldığını saptamışlardır.

Gablıks ve ark. (8), aflatoksin B<sub>1</sub>'in toksisitesini tayin etmek için insanların serviks karsinomundan elde ettikleri HeLa hücre kültürü ile normal dokudan alınan Chang karaciğer hücreleri, ördek ve civciv embryolarından elde edilen iki adet primer hücre kültürü kullanmışlardır. Civciv embryo hücrelerinde ID<sub>50</sub> (İnhibitör Doz) 5,0 µg / ml olarak bulunmuştur. Saptanan ilk sitotoksik etki; hücre üremesinde inhibisyon ile başlamıştır ve bunu sitoplazmanın granüllü görünümü, sitoplazmada yuvarlaklaşma ve daha sonra hücrelerin dökülmesi takip etmiştir. Minimal toksik doz civciv embryosunda 1-5 µg / ml dir. Her hücredeki DNA ,RNA ve proteinin birlikte artışı, buna karşın hücre bölünmesindeki azalma; muhtemelen hücre büyümesindeki olasılığı göstermektedir.

Engelbrecht ve ark. (7), 0,025-0,25 µg / ml'de 24 saat sonra hücre sayılarında ve mitotik figürlerin yüzdesinde bir azalma, 0,125 ile 0,25 µg / ml arasındaki konsantrasyonlarda nukleolusların yapı ve büyüklüğünde bir değişiklik ile nukleoluslarda iki ya da daha çok bölüme ayrılmış ve yarıklanmış gibi görünümle saptamışlardır. Bu şekildeki nukleoluslar küçük olup, bunların gözle farkedilmeleri de güçtür. Ayrıca araştırmacılar nukleuslarda piknoz, karyoreksis ile sitoplazmada vakuolizasyon ve hücre debrilerindeki artış halini dejeneratif değişiklikler olarak gözlemişlerdir. 0,18 µg / ml üzerindeki aflatoksin oranlarında, 48 saatlik sürenin sonunda mitotik figürlerin oranlarında bir azalma, daha yüksek konsantrasyonlarında ise mitozun olmadığı saptanmıştır. Doz yükseldikçe, hücre sayılarında önemli bir azalma ile birlikte çoğu eozinofilik olan birkaç küçük nukleolusa sahip nukleuslar, kromatin materyallerinde bir kayıp göstermişlerdir. Ayrıca geniş sitoplazmik vakuolizasyon, nukleuslarında piknoz ve karyoreksis artışı ve hücrelerde yuvarlaklaşma görülmüştür (7).

Legator ve ark. (18, 19), heteroploid insan embryonik akciğer hücre dizisi L-132 üzerinde aflatoksinin etkisiyle hücrelerde vakuolleşme ile aşırı derecede çok sayıda dev hücreleri ve mitozun baskılandığını saptamışlardır.

Smith (31), monolayer gelişme gösteren maymun böbrek hücrelerine, geliştirme vasatının 1 ml'sine 0,03  $\mu$ g aflatoksin B<sub>1</sub> in ilâvesi ile, gelişmenin hemen hemen total olarak inhibe edildiği ve 3,0  $\mu$ g'lık toksin ile de hücre yıkımlanmasının olduğu saptanmıştır.

Sullman ve ark. (33), aflatoksin B<sub>1</sub>'in ergin insan karaciğer hücrelerinde, embryonik hücrelerden daha az toksik olduğunu saptamışlardır. Bu sonuç, aflatoksinin ergin hayvanlarda, genç hayvanlara göre daha yüksek düzeyde detoksikasyona uğradığı kanısını uyandırmıştır.

### Materyal ve Metot

Aflatoksin B<sub>1</sub>'in canlı hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kullanılan materyal ve uygulanan metot aşağıdadır.

#### 1- Kullanılan Hücreler

##### A) Epitel hücre kültürünün hazırlanması:

Epitel hücresi olarak devamlı Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)-73 no'lu hücre kültürü kullanıldı. Bu hücreler Veteriner Fakültesi Viroloji Bilim Dalı'ndan alındı ve şişede (1000 cc) tek tabaka oluşturacak şekilde etüvde üremeye bırakıldı. Epitel hücrelerinin 48 saatlik sürenin sonunda mikroskop altında tamamen tek tabaka oluşturduğu saptandıktan sonra pasaj yapıldı. Bu amaçla Versen tripsin ve Eagle vasatı kullanıldı. Versen tripsinle hücrelerin şişenin yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. 1000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Üst kısım atıldı. Dipte kalan hücre üzerine bir miktar Eagle vasatı konup 5-10 dakika süreyle pipete edildi. Hücrelerin birbirlerinden tek tek ayrılmaları sağlandıktan sonra 2 adet 1000 cc'lik şişeye 90'ar cc Eagle vasatı ve 10'ar cc serum kondu ve tüpteki hücre ile vasat karışımı da eşit olarak iki şişeye ilâve edildi. 37°C'de 48 saat süreyle inkube edildi. Kontaminasyon olmadığı kontrol edildikten sonra etüvden alınan hücreler santrifüje kadar olan işleme tâbi tutuldu. Sıvı kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 20 cc Eagle vasatı ile 10 dakika süreyle pipete edildi. Pasteur pipetiyle bir miktar alınıp thoma lamının iki gözüne de birer damla kondu ve tüm alana yayılması sağlandıktan sonra mikroskop altında formasyonu düzgün olan hücreler her iki bölmede de sayıldı. Aritmetik ortalamaları alındıktan sonra bu sonuç 96 hücre olarak bulundu. Formüle uygulandığında;

Ortalama hücre sayısı x sulandırma x sabit sayı (10000)  
Mililitrede istenen hücre sayısı

$$\frac{96 \times 20 \times 10000}{5 \times 10^5} : 39 \text{ bulundu.}$$

Bu durumda toplam hacim 40 cc olacak şekilde daha önceden konulan vasata 6 cc serum, 14 cc'de Eagle vasatı konuldu. Pipete edilip 10 adet petri kutusunun herbirine 4'er cc taksim edildi. CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat süreyle inkube edildi.

#### B) Fibroblast hücre kültürünün hazırlanması:

11 günlük 4 adet embriyolu yumurta steril koşullarda açıldı. Embryolar steril bir petride toplandı. Kafa ve ekstremiteleleri uzaklaştırılıp geri kalan kısmı çift bistüri ile parçalanıp steril bir erlene alındı ve PBS-M ile 5 kez yıkandı. % 0,25'lik tripsinden her defasında erlene ilâve etmek suretiyle 20'şer dakika süreyle magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Ağzı tülbentli beherden sıvı kısım süzüldü. Bu süzüntü buz kabı içinde buzdolabında muhafaza edildi. Doku bitince tripsinizasyon işlemi tamamlandı. Bu süzüntü santrifüj tüpüne konup, 1000 devirde 10 dakika süreyle santrifüje edildi. Sıvı kısım atıldı. Dipte yaklaşık 1,5 ml hücre vardı. 1,5 ml Hank's vasatı ve 1,5 ml de serum kondu. Pipete edilip hücrelerin ayrılması sağlandıktan sonra 500 cc'lik kültür şişesine 10 cc serum, 40-50 cc de Hank's vasatı ile 1 ml de eldeki hücreden kondu. 37°C'de 48 saat süreyle etüvde inkube edildi. Sonra santrifüje kadar olan kısım yapıldı. Üst kısım atıldı. Dipte kalan hücreye 10 ml Hank's vasatı konup pipete edildi. Üzerine 4 ml serum, 30 ml Hank's kondu. Tekrar pipete edildi ve dip kısmında birer yuvarlak lamel bulunan Cell Culture Staining Chamber (CCSC)'lerin herbir gözüne 1'er cc olacak şekilde 36 göze de kondu. Kapakları kapatılıp 37°C'de 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı.

#### 2- Aflatoksinin hazırlanışı

Bu çalışmada, Sigma'nın No.A-6636 aflatoksin B<sub>1</sub> maddesi kullanıldı. 1 mg'lik aflatoksinin tamamı 100 ml propilen glikol içinde çözülerek % 1'lik stok bir solüsyon hazırlandı.

#### 3- Aflatoksinin uygulanması

Epitel hücre kültürü için CO<sub>2</sub>'li etüvde üremeye bırakılan petri-lerdeki vasatlar lastik bir puar yardımıyla uzaklaştırılıp 10 adet petriden 2 adeti hücre kontrol olarak, 8 tanesi de 0,25 µg / ml'lik aflatoksin

B<sub>1</sub> verilmek üzere ayrıldı. Bir erlen içine herbir petri kutusu için 4 cc olacak şekilde toplam 32 cc Eagle vasatı kondu. % 1'lik aflatoksin stoktan da 0,8 cc ilâve edildi. Pipete edilip herbir petriye 4 cc konuldu. Hücre kontrollere de sadece Eagle vasatı kondu. CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletildi.

Epitel hücre kültürünün ikinci grup çalışmasında ise aflatoksin B<sub>1</sub>'in dozu iki misline çıkarıldı (0,5 µg/ml).

Aynı dozlarda yine MDBK hücreleri ile ikinci bir çalışma daha yapıldı. Birinci çalışmanın tekrarı niteliğinde olan bu çalışmada 20 adet petri hazırlandı.

Fibroblast hücre kültürü için ise CCSC içindeki hücreler 24 saatlik üremenin sonunda etüvden alınarak hücre kontrolleri ayrıldı ve 0,25 µg/ml'lik doz için herbir göze % 1'lik stoktan 0,025 cc ilave edilirken, 0,5 µg/ml'lik doz için de herbir göze 0,05 cc bu stoktan konuldu. Pipete edildi.

Hücre kültürlerinin hazırlanması ve aflatoksinin uygulanması Fakültemiz Viroloji Bilim Dalı'nda yapılmıştır.

#### 4- *Boyama ve mikroskopik inceleme*

0,25 µg/ml aflatoksin uygulanan epitel kültüründen 2 adeti ile bir hücre kontrol 39. saatte CO<sub>2</sub>'li etüvden alınıp birkaç kez PBS ile yıkandı. Giemsa (Merck) sulandırılmadan hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde ortama kondu. 1,5 dakika sonra boya ortamdan çekilerek 5-6 kez distile su ile yıkandı. Petri kutularının kapakları aralık bırakılarak 12 saat süreyle temiz, tozsuz bir ortamda kurutuldu. 48. ve 72. saatlerde de bu işlemler tekrarlandı.

İkinci grup çalışmada aflatoksinin dozu iki misline çıkarıldı.

Fibroblast kültüründe 24., 48. ve 72. saatler sonunda her defasında hücre kontrolleri ile birlikte CCSC gözlerindeki lameller özel yükselticiler ile yükseltildi, vakum pompası ile sıvı kısım çekildi. PBS ile birkaç kez yıkandı. Saf asetonla 10 dakika süreyle tesbit edildi. Aseton ortamdan uzaklaştırılıp saf Giemsa (Merck) ile 1,5 dakika süreyle lameller boyandı ve distile su ile yıkandı. Etüvde kurutulup, entallen ile lam üzerine yapıştırıldı.

Boyanan petri kutuları ve lameller ışık mikroskopunda (Leitz-orthomat araştırma mikroskobu) incelendi ve hücrelerin fotoğrafları çekildi.



### Bulgular

#### *Epitel hücreleri üzerinde değişik dozlarda kullanılan aflatoksin B<sub>1</sub>'in etkisi*

Aflatoksin B<sub>1</sub> (0,25 µg / ml) dozunda: 24. saatte, kontrol kültürlerde hücrelerde üniformite belirgin olduğu halde, bu hücrelerde üniformite kaybolmaya başlamıştı. Hücrelerde fazla bir değişiklik seçilmemekle beraber, bazı hücre adalarında diğer hücrelere oranla daha koyu boyanmış hücreler görüldü.

48. saatte, hücreler, kontrol kültürlerdeki hücrelerin aksine üniform yapıda değillerdi. Bazı hücrelerin sitoplazmaları genişlemiş ve sınırları seçilemiyordu. Bu şekildeki hücrelerde vakuolleşme belirgindi. Yer yer oldukça koyu boyanmış dejenere epitel hücreleri seçildi. Bazı hücrelerde nukleuslar iri bir görünüm almışlardı. Nukleuslar genellikle birden fazla nukleolus içermektedir.

72. saatte, normal kültürlerde çok sayıda hücrenin hemen hemen tüm alanı kaplamış olmasına ve dejenerasyona ait herhangi bir bulguya pek rastlanılmamasına karşın, bu kültürlerde hücreler, kaldırım taşı gibi yapılarını kaybetmiş ve trabeküler şekilde oluşum göstermişlerdi. Birkaç hücreden ibaret küçük hücre adacıkları şekillendirmişlerdi. Çok sayıda, oldukça koyu boyanmış hücreler sahaya hakimdi. Geniş sitoplazmalı, dejenere epitel hücreleri çok sayıda vakuol içermektedir.

Aflatoksin B<sub>1</sub> (0,5 µg / ml) dozunda: 24. saatte, normal kültürlerdeki epitel küme oluşumları yerine, toksin ilâveli kültürlerde kordon ya da trabekül oluşumları görüldü. Hücreler arasında dissosiyasyon belirgindi. Ayrıca arada dejenere, geniş sitoplazmalı tek tük hücreler de seçildi.

48. saatte, normal kültürlerle oranla, toksin ilâveli kültürlerde, küçük hücre adacıkları oluşturmuş olan epitel hücrelerinden hemen hemen hepsinin oldukça koyu boyanmış olması dikkat çekiciydi. Hücre içinde nukleus seçilemiyordu. Hücreler, trabeküler uzantılar şekillendirmişlerdi. Hücre sınırları seçilemiyordu.

72. saatte, hücre kümelerinin yerini, dejenere, yuvarlaklaşmış, bir veya birkaç hücreden oluşmuş hücre kümeleri artıklarına terkettiği görüldü. Arada geniş sitoplazmalı, sitoplazma sınırları kaybolmuş ve çekirdeklerini yitirmiş olan nekrobiyotik ve nekrotik hücre artıkları saptandı ve bu hücrelerin sitoplazmalarının asidofilik boyandığı dikkati çekti.

*Fibroblastlar üzerinde değişik dozlarda kullanılan aflatoksin B<sub>1</sub>'in etkisi*

Aflatoksin B<sub>1</sub> (0,25 µg / ml) dozunda: 24. saatte, normal kültürlerde geniş alanlar halinde görülen fusiform hücre toplulukları yerine yer yer poligonal sitoplazmalı ve yer yer de fusiform yapıda olan hücreler görüldü. Özellikle geniş sitoplazmalı olan hücrelerde vakuolleşme belirgindi. Arada bazofilik sitoplazmalı, çekirdekleri seçilemeyen iğ biçiminde hücrelere rastlandı. Ayrıca bazı sahalarda tek tük piknotik çekirdek yapıları da dikkati çekti.

48. saatte, kontrol kültürlerdeki gibi, hücre toplulukları, geniş alanlar oluşturamamış olup, genelde tek tek ya da küçük hücre adacıkları şeklindeydi. Yer yer de çok geniş poligonal sitoplazmalı (üçgen, beşgen şeklinde), ayrıca dejenere olup yuvarlaklaşmış veya oval bir şekil almış ya da sadece çekirdek yığınından ibaret oluşumlar gözlemlendi. Hücre üremesi belirgin olarak azalmıştı.

Fibroblast kültürlerindeki yukarıda açıklanan bulguların aynı saatlerde epitel kültürlerinde saptanan bulgulardan daha şiddetli olarak geliştiği dikkati çekti.

72. saatte, bazı alanlarda 2-3 adet poligonal hücrenin biraraya gelerek oluşturdukları hücre adacıkları seçilmekle birlikte genelde, yuvarlaklaşmış oldukça koyu boyanmış ve tek tek seçilen hücreler dikkati çekti. Ayrıca bazofilik sitoplazmalı, çekirdekleri seçilemeyen iğ biçiminde hücreler gözlemlendi. Kısmen bütünlüğünü koruyan hücrelerde ise yoğun bir vakuolleşme kendini gösterdi. Hücre sayısı belirgin bir şekilde azalmıştı.

Aflatoksin B<sub>1</sub> (0,5 µg / ml) dozunda: 24. saatte, hücre sayısı yoğun olmakla beraber genelde yuvarlaklaşmış ve nukleus yapısı tam seçilemeyen koyu boyanmış hücreler alana hakimdi. Alanda birden fazla nukleus içeren dev hücre formasyonları gözlemlendi. Gerek dev hücrelerinin sitoplazmasında, gerekse tek tek olupta sitoplazmaları açık renkte olan hücrelerde vakuolleşme belirgindi.

48. saatte, hücre sayısı normal kültürlerle oranla azalmış, fakat yine çok çekirdekli dev hücre yapıları, oldukça koyu boyanıp yuvarlaklaşmış olan piknotik görünümlü hücreler ile gerek dev hücrelerinde gerekse tek tek seçilen hücrelerde vakuolizasyon dikkati çekti.

72. saatte, mikroskop alanında çok az sayıda hücre seçilebiliyordu. Tek tük rastlanan bu hücreler poligonal ya da fusiform yapısını

tamamen kaybetmiş ve hemen tamamı yuvarlak, koyu kitleler halini almıştı. Nukleus kesinlikle seçilemiyordu. Hücrelerin bazıları daha koyu boyanmış olmakla beraber, bazılarında belli belirsiz bir sitoplazma seçilebiliyordu.

### Tartışma ve Sonuç

Aflatoksinlerin insan ve hayvanlardaki toksik etkileri, gerek in vivo (11, 26, 32, 34, 38) ve gerekse invitro (4, 5, 7, 8, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 22, 29, 32, 33, 40) çalışmalarla saptanmış olup, bu konuda çeşitli yayınlar bulunmaktadır.

Doku kültürlerinde aflatoksinlerle ilgili çalışmalarda araştırmacıların kullandıkları aflatoksinin dozu, aflatoksinin türüne ve kullanılan hücrenin çeşidine göre değişmekle beraber genellikle 0,025  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ile 7,0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  arasındadır. Bu çalışmada da, birçok araştırmacının bu konuda yapmış olduğu çalışmalarda olduğu gibi (4, 5, 7, 8, 9, 11, 15, 17, 18, 19) bu sınırlar arasında kalan 0,25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ile 0,5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  dozları kullanılmıştır.

Bu maddelerin toksik etkileri, araştırmada kullanılan maddenin miktarına, uygulama süresine ve testin sistemine göre değişmekle beraber genelde yüksek dozda öldürücü, düşük dozlarda ise histolojik değişmelere yol açmakta (3, 36) ve bu yönüyle in vivo olarak elde edilen bulgular invitro elde ettiğimiz bulgularla paralellik arz etmektedir.

Çalışmalarımızda kullandığımız standart MDBK hücreleri ile civciv embriyosu fibroblast kültürleri karşılaştırıldığında; denemenin ilk iki gününde fibroblast hücre kültüründeki morfolojik değişiklikler daha şiddetli görülmekle beraber, 72. saatte her iki kültürde de özellikle yüksek doz (0,5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) uygulanmasında bulguların benzer olduğu saptanmıştır. Yapılan araştırmalarda (40), FDB gibi primer hücre kültürlerinin MDBK gibi standart hücre kültürlerinden sitotoksik etki yönünden en az 4 misli daha fazla duyarlı olduğu, ayrıca aflatoksin uygulanmasından sonra 72. saatte duyarlılığın daha yüksek seviyeye ulaştığı ve MDBK hücrelerinin sitoplazmalarının aflatoksin  $B_1$  etkisiyle iç biçimini aldığı görülmüştür. Bu bulguların, çalışmamızda seçilen bulgularla benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

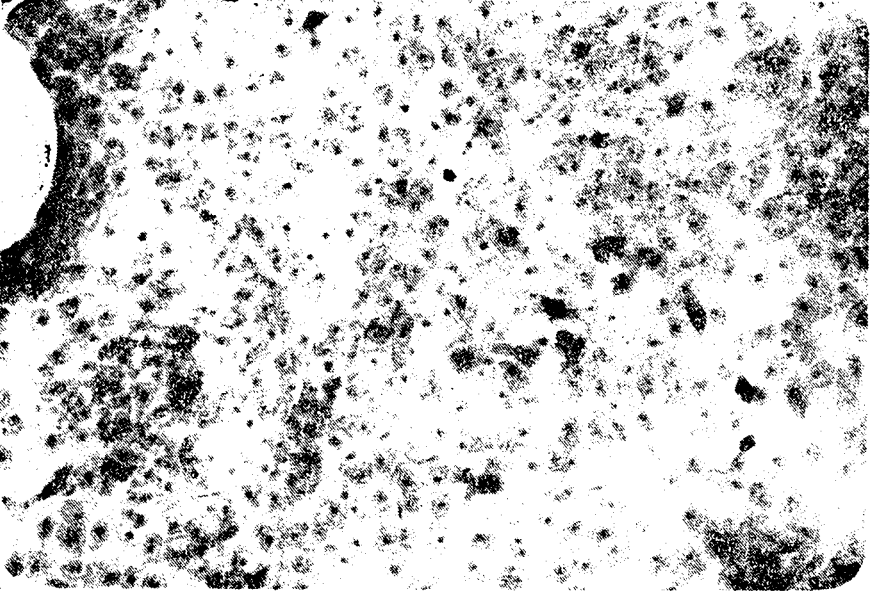
Gablıks ve ark. (8), aflatoksin  $B_1$ 'in toksisitesini tayin etmek için; HeLa hücre kültürü, insan chang karaciğer hücreleri ile ördek ve civciv embriyolarından elde edilen iki adet te primer hücre kültürü kullanmışlar ve ilk sitotoksik etki olarak hücre üremesinde bir inhibisyon görmüşlerdir. Bunu takiben sitoplazmada şekillenen progresiv bir

granulasyon, yuvarlaklaşma ve daha sonra hücrelerin dökülmesi gibi bulgular (DNA, RNA ve proteindeki birlikte artışa karşı hücre bölünmesindeki azalma sonucu şekillendiği bildirilen hücre büyümesi) bizim çalışmalarımızda elde ettiğimiz bulgularla paralellik göstermektedir. Ayrıca aynı araştırmacılar (8), toksik yerfıstığı ile besledikleri rat ve ördek yavrularında; dokuların histolojik bakışında, hipertrofik hücreler ve büyümüş çekirdekler gözlemişlerdir ki, bu *invivo* çalışmalar yaptıkları *invitro* çalışmalarla uyum göstermiştir. Bu araştırmacıların *invivo* elde ettiği bulgularla çalışmamızda da seçilen ve yukarıda açıklanan bulgular paralellik göstermektedir.

Engelbrecht ve ark. (7)'nin böbrek epitel hücre kültürlerinde aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'den hazırlanmış oldukları % 92'lik aflatoksinini kullanmaları sonucunda 0,025-0,25 µg/ml'lik dozda hücre sayısı ve mitotik figürlerin yüzdesinde bir azalma saptamışlardır. Burada bu bulgularla bizim bulgularımız arasında bir benzerlik görülmektedir. Ayrıca bu araştırmacılar, bizim yüksek doz olarak kullandığımız dozu 0,5 µg/ml kullanmayı tercih etmişler ve daha çok nukleoluslardaki değişiklikler üzerinde durmuşlardır. Nukleoluslardaki piknoz, karyoreksis ile sitoplazmada saptadıkları vakuolizasyon ve hücre debrisindeki artış ile karakterize olan dejeneratif değişiklikler, çalışmamızda saptanan bulgularımızla bir benzerliğin olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde belirtilen (7) ve hücrelerin birçoğunda şekillenmiş olduğu saptanan fragmentasyon ile nukleolusun küçülmesi ve kromatin üretimindeki azalma sonucu hayâli nukleolusların şekillenmesi, rastladığımız bulgularımız arasındadır. Çalışmamızda kültürlerde rastlanan mitotik hücre oranının aflatoksinli kültürlerde azalmış olması, literatürlerdeki (7, 9, 18, 19) verilerle paralellik göstermektedir. Ancak pseudoprofaz ve bloke edilmiş metafazda bir artışın olması ve normal mitozdaki azalmaya karşı, fazlaca görülen anormal formlar (7) bulgularımız arasında değerlendirilemedi. Buna karşı Legator ve ark. (19)'nin heteroploid insan embriyonik akciğer hücre dizisi L-132 üzerine aflatoksin uygulanması sonucu hücrelerde tesbit ettikleri vakuolleşme ile birlikte çok sayıda dev hücresi oluşumları, çalışmamızda saptanan bulgularla benzerlik göstermektedir.

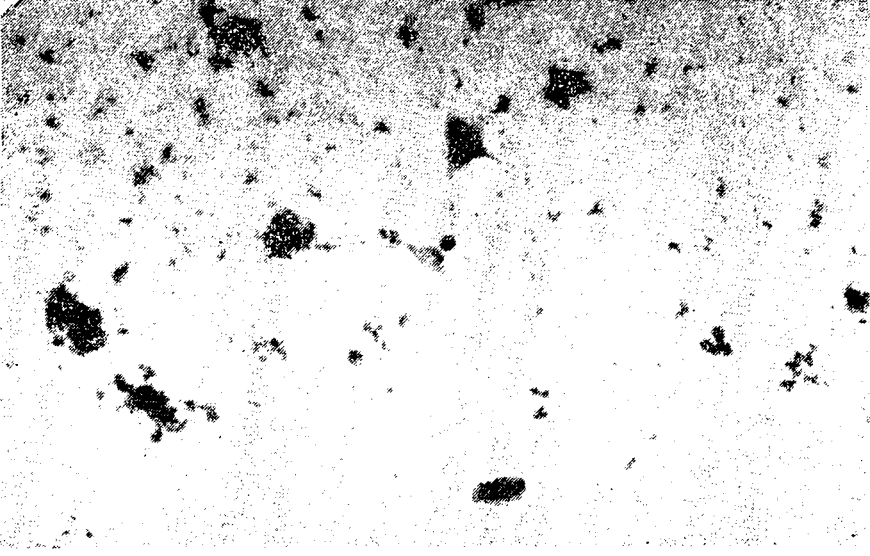
Yapılan bu çalışmada civciv embriyosu fibroblastlarının denemenin ilk iki gününde aflatoksin B<sub>1</sub>'e karşı standart epitel hücrelerine oranla daha fazla duyarlılık göstermesi, fibroblastların embriyonal mezodermal kökenli hücreler olması ile açıklanabilir.



Resim 1. Normal epitel kültürü, kaldırım taşı görünümü, 72. saat, Giemsa, x700.  
(The normal epithelial culture).



Resim 2. Epitel hücreleri (Af. B, 0,5 µg / ml), küçük hücre adacıkları, 48. saat. Giemsa, x900.  
(The epithelial cells (Af.B, 0,5 µg / ml), the small islets of cells, following 48-hr treatment).



Resim 3. Epitel hücreleri (Af.B, 0,5 µg/ml), nekrobiyotik ve nekrotik hücre artıkları, 72. saat, Giemsa, x350.

(The epithelial cells (Af.B, 0,5 µg/ml), necrobiotic and necrotic cells, following 72-hr treatment).



Resim 4. Normal fibroblast kültürü, Giemsa, x1400.  
(The normal fibroblastic culture)



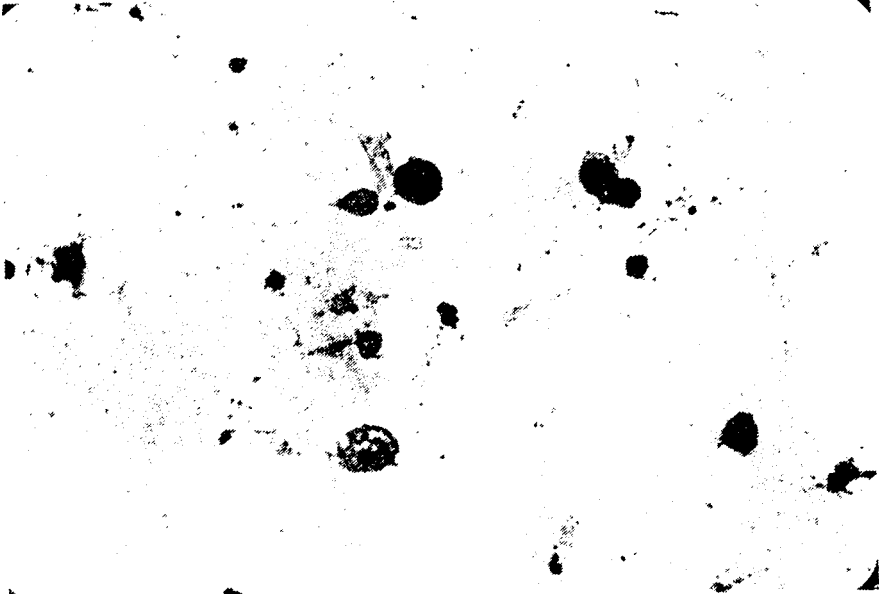
Resim 5. Fibroblastlar (Af.B, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), poligonol stiplazmalar, yuvarlaklaşmış, çekirdek yığılmasından ibaret hücreler, 48. saat, Giemsa,  $\times 1400$ .  
(The fibroblastic cells (Af.B, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) polygonal cytoplasm, small and rounded nuclear debris.48-hr).



Resim 6. Fibroblastlar (Af.B, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), dev hücre formasyonları, yuvarlaklaşmış dejenere hücreler, 24. saat, Giemsa,  $\times 1400$ .  
(The fibroblastic cells (Af.B, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) giant-cell formation rounded cells, following 24-hr treatment).



Resim 7. Fibroblastlar (Af. B, 0.5 µg / ml), çok çekirdekli dev hücre yapıları, yuvarlak piknotik çekirdekli hücreler, 48. saat, Giemsa, x1400.  
(The fibroblastic cells (Af.B, 0.5 µg / ml), giant cell formation, rounded cells with picnotic nuclei. 48-hr after treatment).



Resim 8. Fibroblastlar (Af.B, 0.5 µg / ml), çok az sayıda yuvarlak, koyu kitleler halinde hücre artıkları, 72. saat, Giemsa, x1400.  
(The fibroblastic cells (Af.B, 0.5 µg / ml), a few rounded and small cells. Basophilic cell debris. 72-hr after treatment).



## Kaynaklar

1. Allcroft, R., Carnaghan, R.B.A., Sargeant, K., O'Kelly, J. (1961). *A toxic factor in Brazilian groundnut meal*. Vet. Rec., 73: 428-429.
2. Arda, M. (1980). *Mikoloji*. A.Ü. Vet.Fak. Yayn. 366, Ders Kitabı, 264, A.Ü. Basımevi, Ankara, 260-269.
3. Cregler, A., Lillehoj, E.B. (1968). *Mycotoxins*. Appl. Microbiol., 10: 155-219.
4. Decad, G.M., Dougtery, K.K., Hsieh, D.P.H., Byard, J.L. (1978): *Comparative metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in mouse and rat primary hepatocyte cultures*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 45: 274.
5. Decad, G.M., Dougtery, K.K., Hsieh, D.P.H., Byard, J.L. (1979). *Metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in cultured mouse hepatocytes: Comparison with rat effects of cyclohexene oxide and diethyl maleate*. Toxcol. Appl. Pharamcol., 50: 429-436.
6. Edds, G.T. (1973). *Acute aflatoxicosis: A review*. J.A.V.M.A., 162: 304-309.
7. Engelbrecht, J.C., Purchase, I.F.H. (1969). *Changes in morphology of cell cultures after treatment with aflatoxin and ochratoxin*. S. Afr. Med. J., 43: 524-528.
8. Gabliks, J., Schaeffer, W., Friedman, L., Wogan, G. (1965): *Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on cell cultures*. J. Bacteriol., 90: 720-723.
9. Garnett, H.M. (1978). *Alterations in the expression of the cytoemegalovirus-induced cytopathogenic effect in fibroblasts by aflatoxin B<sub>1</sub>* Br. J. Exp. Path., 59: 640-643.
10. Hamilton, P.B. (1982). *Mycotoxins and farm animals*. Refuah Vet., 39: 17-39.
11. Hanigan, H.M., Larshes, B.A. (1984). *Toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in rat and mouse hepatocytes invivo and invitro*. Toxicology, 30: 185-193.
12. Hartley, R.D., Nesbitt, B.F., O'Kelly, J. (1963). *Toxic metabolites of Aspergillus flavus*. Nature, 198: 1056-1058.
13. Hayes, W. (1976). *Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> and rubratoxin B on bacteriophage and rabbit cornea cells*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15: 665-669.
14. Hesseltin, C.W., Shotwell, O.L., Ellis, J.J., Stubblefield, R.D. (1966). *Aflatoxin formation by Aspergillus flavus*. Bacteriol. Rev., 30: 795-805.
15. Juhasz, S., Greczi, E. (1964). *Extracts of mould-infected groundnut in tissue culture*. Nature, 203: 861-862.
16. Kaya, S. (1984). *Mitokoksiner: hayvan ve insan sağlığı yönünden önemi*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 31: 388-409.
17. Kinzie, J.M., Lrewellyn, G.C. (1979). *Invitro effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the uptake of <sup>14</sup>C-orotic acid into kidney, liver and muscle tissue of the mongolian gerbil, Meriones unguiculatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23: 491-496.
18. Legator, M. (1966). *Biological effects of aflatoxin in cell culture*. Bacteriol. Rev., 30: 471-477.
19. Legator, M.S., Zuffante, S.M., Harp, A.R. (1965). *Aflatoxin: effect on cultured heteroploid human embryonic lung cells*. Nature, 23: 345-347.
20. Loosmore, R.M., Harding, J.D.J. (1961). *A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs*. Vet. Rec., 73: 1362-1364.

21. Loosmore, R.M., Markson, L.M. (1961). *Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal*. Vet.Rec., 73: 813-814.
22. Mathur, C.F., Smith, R.C., Hawkins, G.E. (1975). *Growth and morphology of Streptococcus bovis and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> invitro*. J. Dairy Sci., 59: 455-457.
23. Neshitt, B.F., O'Kelly, J., Sargeant, K., Sheridan, A. (1962). *Toxic metabolites of Aspergillus flavus*. Nature, 195: 1062-1063.
24. Pier, A.C. (1973). *An overview of the mycotoxicoses of domestic animals*. J.A.V.M.A., 163: 1259-1260.
25. Pter, A.C., Richard, J.L., Cysewski, S.J. (1980). *Implications of mycotoxins in animal disease*. J.A.V.M.A., 176: 719-724.
26. Portman, R.S., Plowman, K.M., Campbell, T.C. (1970). *On mechanism affecting species susceptibility to aflatoxin*. Biochim. Biophys. ACTA, 208: 487-495.
27. Richard, J.L., Lyon, R.L. (1986). *Aflatoxins and their detection in animal tissues and fluids*. J. Toxicol.-Toxin Reviews, 5: 197-215.
28. Robertson, J.A., Pons, W.A., Goldblatt, L.A. (1967). *Preparation of aflatoxins and determination of their ultraviolet and fluorescent characteristics*. J. Agr. Food Chem., 15: 798-801.
29. Roebuck, B.D., Siegel, W.G., Wogan, G.N. (1978): *Invitro metabolism of aflatoxin B<sub>2</sub> by animal and human liver*. Cancer Res., 38: 999-1002.
30. Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A. (1975). *Investigation of suspected cases of mycotoxicosis in farm animals in Britain*. Vet. Rec., 97: 275-278.
31. Smith, R.A. (1963). *The influence of toxins of Aspergillus flavus on the incorporation of (C<sup>14</sup>) leucine into proteins*. Biochem. J., 88: 50-51.
32. Sporn, M.B., Dingman, C.W., Phelps, H.L., Wogan, G.N. (1966). *Aflatoxin B<sub>1</sub>: Binding to DNA invitro and alteration of RNA metabolism invivo*. Science, 151: 1539-1541.
33. Sullman, S.F., Armstrong, S.J., Zuckermen, A.J., Rees, K.R. (1970). *Further studies on the toxicity of the aflatoxins on human cell cultures*. Br. J. Exp. Path., 51: 314-316.
34. Ueno, I., Friedman, L., Stone, C.L. (1980). *Species difference in the binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to hepatic macromolecules*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 52: 177-180.
35. Wannop, C.C. (1961). *The histopathology of Turkey "X" Disease in Great Britain*. Avian Dis., 5: 371-381.
36. Wogan, G.N. (1966). *Chemical nature and biological effects of the aflatoxins*. Bacteriol. Rev., 30: 460-470.
37. Wogan, G.N. (1975). *Mycotoxins*. Annu. Rev. Pharmacol., 15: 437-451.
38. Wogan, G.N., Edwards, G.S., Newberne, P.M. (1971). *Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs*. Cancer Res., 31: 1936-1942.
39. W.H.O. (1979). *Environmental Health Criteria 11, Mycotoxins*. Geneva, World Health Organization, pp. 1-127.
40. Yoneyama, M., Sharma, R.P., Elsner, Y.Y. (1987). *Effects of mycotoxins in cultured kidney cells: cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in Madin-Darby and primary fetal bovine kidney cells*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 13: 174-184.