

Embriyonik Dönemde Döngüsel Aydınlatma Yapılan Etlik ve Yumurtacı Cıvcıvlerinin Purkinje Hücrelerinde Bazı AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırılması

Gamze TURGAY-İZZETOĞLU¹, İrem Nur SERBESTOĞLU², Sezen ÖZKAN³, Servet YALÇIN⁴

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bornova-İZMİR, ²Ege Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi Bornova-İZMİR, ^{3,4}Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Bornova-İZMİR

¹<https://orcid.org/0000-0001-9828-2402>, ²<https://orcid.org/0000-0002-7425-8325>, ³<https://orcid.org/0000-0002-9637-882X>

⁴<https://orcid.org/0000-0003-4194-0536>

✉: gamze.turgay@ege.edu.tr

ÖZET

Aydınlatma, modern tavuk yetiştiriciliğinde, üreme, büyüme, vücut sıcaklığı, yem tüketimi ve sindirim olayları da dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci etkileyen ve metabolik olaylarda belirleyici rol oynayan önemli unsurlardan biridir. Aydınlatmaya bağlı olarak oluşan değişiklikler, sinir sistemi ve endokrin sistemin görev aldığı fizyolojik olaylar sonucu meydana gelmektedir. Purkinje hücreleri, merkezi sinir sisteminin en iri hücrelerindedir. Bu hücreler, tavuk embriyosunun ilk günlerinde beyincik korteksine göç edip, kendilerine ait hücre tabakasını meydana getirmektedirler. DNA'nın rRNA sentezleyen genlerini içeren ve nukleolusu oluşturan bölgeleri, nukleolus düzenleyici bölgeler (NOR) olarak adlandırılmaktadır. NOR'ların gümüşleme metoduyla (AgNOR) aktif olarak transkripsiyon yapan bölgelerinin boyanması sırasında rRNA bölgeleri de boyanarak, ışık mikroskopunda küçük, koyu benekler halinde görünmektedirler. Bu çalışmada; etlik ve yumurtacı damızlık yumurtalarına kuluçkada uygulanan günlük döngüsel aydınlatmanın (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) beyincikte Purkinje hücrelerinde hem histolojik (luxol fast blue & cresyl violet) hem de bu hücrelerin nukleus çap ve alanları ile NOR alanları (AgNOR gümüş boyama yöntemi ve istatistiksel analiz) üzerine etkisi incelenerek ileride yapılacak olan benzeri çalışmalara temel veriler sağlanması amaçlanmıştır. Kuluçkada aydınlatmanın kontrol grubuna göre etlik cıvcıvlerde Purkinje hücrelerinde nukleus alanı ile NOR alanını, yumurtacılar da ise nukleus çapını artırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, kuluçkada aydınlatmanın etlik cıvcıvlerde Purkinje hücrelerinde protein sentezini artırdığı dolayısı ile sitoplazmalarındaki protein miktarında artışa bağlı olarak nukleus alanının genişlediği yargısına varılmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 23.12.2020

Kabul Tarihi : 11.02.2021

Anahtar Kelimeler

Cıvcıv beyinciği
Purkinje hücresi
NOR (Nukleolus Düzenleyici Bölgeler)
Luxol fast blue&Cresyl violet
AgNOR

The Comparasion of Some AgNOR Parameters of Purkinje Cells in The Laying and Broiler Chicks Exposed to Daily Cyclic Lighting During The Embryonic Period

ABSTRACT

Lighting, in modern poultry breeding, is one of the most important factors affecting the physiology of birds, including reproduction, growth, body temperature, feed consumption and digestion, also plays an impressive role in metabolic events in the body. Changes caused by lighting occur as a result of physiological events associated with the nervous system and the endocrine system. Purkinje cells are one of the largest cells of the central nervous system. In the early days of the chicken embryo, these cells migrate to the cerebellum cortex and form their own cell layer. The regions of DNA that contain rRNA-synthesizing genes and form the nucleolus called Nucleolar Organizer Regions (NOR). During the staining of actively transcribing regions of NORs with the silvering method (AgNOR), the rRNA regions are also stained and appear as small, dark spots under light microscope. This study aimed to determine the effect of 16 h light:8 h dark lighting

Research Article

Article History

Received : 23.12.2020

Accepted : 11.02.2021

Keywords

Chick cerebellum
Purkinje cell
NOR (Nucleolar Organizer Regions)
Luxol fast blue&Cresyl violet
AgNOR

during incubation on histology, nucleus diameter, areas of these cells and NOR areas of the Purkinje cells of the cerebellum of chicks to provide basic data for similar studies to be carried out in the future. The results showed that lighted incubation increased nucleus areas and NOR areas of the Purkinje cells of the broiler chicks compared to control and increased nucleus diameters of laying chicks. It was concluded that, lighting during incubation increased protein synthesis in the Purkinje cells of broiler chicks and the amount of protein in their cytoplasm resulting in an increase in nucleus area.

- Atıf İçin:** Turgay İzzetoğlu G, Serbestoğlu İN, Özkan S, Yalçın S 2021. Embriyonik Dönemde Döngüsel Aydınlatma Yapılan Etlik ve Yumurtacı Cıvıvlerinin Purkinje Hücrelerinde Bazı AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1333-1342. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.845203.
- To Cite:** Turgay İzzetoğlu G, Serbestoğlu İN, Özkan S, Yalçın S 2021. The Comparasion of Some AgNOR Parameters of Purkinje Cells in The Laying and Broiler Chicks Exposed to Daily Cyclic Lighting During The Embryonic Period. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1333-1342. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.845203.

GİRİŞ

Kanathlı sinir sistemi de memelilerde olduğu gibi ektodermden köken alır. *Kanalis nörالیşin* ön ucunun kapanması ve gelişmesiyle beyin vezikülü ya da beyin kabarcığı şekillenir. *Ensefalon* adını alan bu yapının boğumlanması ile meydana gelen *rombensefalon* (arka beyin), 72 saatlik tavuk embriyosunda, morfolojik olarak *metensefalon* (art beyin) ve *miyelensefalon* (son beyin) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Embriyonik dönemin sonuna doğru dorsal metensefalik bölgeden ise beyincik gelişir. Beyincik; sağ ve sol *serebral hemisferler* (yarıküreler), ortada iki yarıküreyi bağlayan *vermis serebelli* ve hemisferlerin dış yüzündeki *folya* adı verilen derin kıvrımlardan meydana gelmektedir. Beyincik hasarları, ince motor becerilerin kaybı ile ilişkilidir. Bu sebeple, beyin motor merkezi olarak kabul edilen beyincik dengeyi sağlamak ve kas hareketlerini koordine etmek gibi önemli işlevlere sahiptir (Herrup ve Kuemerle, 1997; Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018).

Gelişimini tamamlamış bir beyincik, *korteks* (gri madde) ve *medulla* (ak madde) olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Korteks tabakası, tekrar üç tabakaya ayrılır. Bunlar dıştan içe doğru; en az hücre sayısına sahip olan moleküler tabaka (*stratum molekulare*), ortada Purkinje hücreleri ile bunları çevreleyen sepet hücrelerinden oluşan Purkinje hücresi tabakası (*stratum gangliosum*) ve içte en yoğun hücre popülasyonuna sahip olan granüler tabaka (*stratum granulosum*)'dır (Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018; Öber ve Turgay-İzzetoğlu, 2020). Bütün bu korteks tabakaları; 8 tip nöron (*Purkinje hücreleri*, *Lugaro hücreleri*, *sepet hücreleri*, *unipolar fırçamsı hücreler*, *yıldız hücreleri*, *Candlebrum hücreleri*, *Golgi hücreleri*, *granüler hücreler*), gliya hücreleri, bu hücrelerin uzantıları ve kan damarlarını içermektedir. Medulla tabakasında ise nöron bulunmaz. Beyinciğin genel histolojik yapısının kuluçka çıkışından sonra tamamlandığı bilinmektedir (Akar ve Sur, 2010; Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018).

Purkinje hücreleri, merkezi sinir sisteminin en iri

hücrelerindedir. Bu hücreler, tavuk embriyosunun 3. ve 5. günleri arasında şekillenmeye başlar ve beyincik korteksine göç edip, kendilerine ait hücre tabakasını (*stratum gangliosum*) meydana getirirler. Yapılan çalışmalarda, 13. günde Purkinje hücrelerinin üç sıra halinde dizildiği ve altlarındaki granüler tabakanın henüz tam düzenlenmediği; 17. günde ise, Purkinje hücrelerinin tek sıra halinde düzenlendiği ve moleküler tabakanın belirginleştiği bildirilmiştir (Espinari ve ark., 1997; Luo ve ark., 2004; Akar ve Sur, 2010). Purkinje hücreleri beyinciğin tek eferent hücreleridir. Aşırı dallanma gösteren dendritleri moleküler tabakaya uzanırken, aksonları ise medullaya kadar ulaşarak orada yer alan nöronların nukleusları ile bağlantı kurup iletimi sağlamaktadır. Purkinje hücreleri sitoplazmalarında bol miktarda iri Nissl tanecikleri içermektedirler (Akar ve Sur, 2010; Karol ve ark., 2010; Kandel ve ark., 2013).

Aydınlatma, modern tavuk yetiştiriciliğinde; üreme, büyüme, vücut sıcaklığı, yem tüketimi ve sindirim olayları da dahil olmak üzere birçok metabolik olaya etki eden unsurlardan biridir. Işık, kanathlılarda retinal ve ekstra retinal bölgelerdeki fotoreseptör hücreler üzerinden algılanarak hipotalamus ve hipofiz bezini harekete geçirmekte böylece büyüme, cinsel olgunluk ve yumurta verimini etkilemektedir (Lewis ve Morris, 2006). Kontrollü aydınlatmayla kanathlılarda oluşan değişikliklerin, sinir sistemi ve endokrin sistem arasındaki fizyolojik olaylar sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Düşük yoğunlukta sürekli aydınlatılan piliçler daha uysal olmakta ve çeşitli uyarıcı aydınlatma programlarına maruz kalan piliçlere göre daha az hareket etmektedirler (Kristensen ve ark., 2006). Piliçlere karanlık dönem sağlayan programların ise fizyolojik stresi azalttığı, bağışıklık yanıtını iyileştirdiği, uyuma davranışını düzenlediği, hayvanların hareketliliğini arttırdığı ve hızlı gelişme sonucu oluşan ani ölümleri azalttığı gösterilmiştir (Bayram ve Özkan, 2010; Prescott ve ark., 2004; Schwan-Lardner ve ark., 2016). Bu kapsamda başta AB olmak üzere bazı ülkelerde piliç üretimini düzenleyen yasalar, üretim dönemi boyunca

4 saati kesintisiz olmak üzere en az 6 saatlik bir karanlık periyodu zorunlu kılmıştır (Schwean-Lardner ve ark., 2016). Piliçlere karanlık periyotların sunulması ile ortaya çıkan olumlu etkilerin, gece karanlığında salınımı artan melatonin hormonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kliger ve ark., 2000). Tavuklara, embriyo döneminden itibaren 6 saatin üzerinde karanlık döngü içeren bir aydınlatma programının, yumurtadan çıkış sonrasında stres etmenlerine uyumu arttırdığı, gelişmeyi ve refahı olumlu etkilediği saptanmıştır (Archer ve ark., 2009; Özkan ve ark., 2012). Öte yandan Riedstra ve Groothuis (2004) embriyo dönemi aydınlatmanın civcivlerin çıkış sonrası davranışlarında değişiklik oluşturduğunu ve aydınlatma yapılan gruplarda tüy gagalama davranışının arttığını saptamışlardır. Benzer şekilde Dayıoğlu ve Özkan (2013) kuluçka döneminde aydınlatma uygulaması ile etlik civcivlerin erken yaşta (2 haftalık) daha hızlı geliştiğini, yem tüketim ve sosyal gagalama davranışları sergileme sıklığının daha yüksek olduğunu ve korkaklıkla ilişkili davranışların ise azaldığını bildirmiştir. Bu nedenle fizyolojik ve davranışsal değişiklikler ile sinir sisteminin aktivite ile ilişkilendirilen beyin bölgelerindeki hücrelerin gelişimi arasındaki ilişki araştırmaya değer niteliktedir.

Öte yandan sirkadiyen salınım gösteren melatonin hormonunun salgılanma ritminin (aydınlıkta düşük, karanlıkta yüksek) erken oluşması da gelişme ve davranışsal değişikliklerle ilişkilendirilebilmektedir (Kozanoğlu, 2010; Özkan ve ark., 2012).

Hücrede ribozomal alt birimler nukleolusta sentezlenmektedir. Ökaryotik ribozomal RNA'ları sentezleyen genler, canlı türlerinde belirli kromozomlarda yer alırlar. Bu kromozomların ribozomal RNA (rRNA) sentezleyen bölümleri, interfazdaki bir hücrenin nukleusunda belirli bölgelerde toplanarak koyu bölgeleri oluştururlar. Buna göre DNA'nın rRNA sentezleyen genlerini içeren ve nukleolusu oluşturan bölgeleri nukleolus düzenleyici bölgeler (*Nucleolus Organizer Regions* veya NORs) olarak adlandırılmaktadır. rRNA genleri protein sentezinde önemli rol oynamaktadır. Bundan dolayı NOR'ların sayıları ve görünüşleri hücrelerin nukleer aktivitesini ve ribozom yapım ve protein sentez hızına bağlı olarak, hücre çoğalma hızını yansıtır (Trerè, 2000; Kuş ve ark., 2003; Aydın ve Çelik, 2005; Akar ve Sur, 2010). Türler arasında kromozom sayısı bakımından farklar olduğu gibi NOR içeren kromozom sayısı ve hücrelerdeki AgNOR (NOR'lar ile etkileşimde bulunan ve gümüşle boyanan proteinler) sayıları bakımından da farklar vardır (Sur ve ark., 2003; 2011). Örneğin, tavuk genomu 9 çift makro ve 30 çift de mikro-kromozom olmak üzere toplam 78 kromozomdan oluşmakta; NOR sayısı da 2 olup, bunlar 16 numaralı mikro-kromozom çifti üzerinde yer almaktadır (Masabanda ve ark., 2004).

AgNOR'ların nukleustaki lokalizasyonları ve yerleşimleri de farklı olabilmektedir. Bu durum, nukleusun yapısı ve aktivitesi ile ilgilidir. Özellikle merkezi sinir sistemindeki nöronlar, büyüklük ve dolayısıyla da nukleus büyüklükleri bakımından birbirlerinden oldukça farklı hücreler oldukları için, AgNOR yerleşimleri de bu hücrelerde farklılıklar göstermektedir (Gündüz ve Öznurlu, 2014; Akbulut ve ark., 2015).

Hücre nukleusunda NOR'ların gümüşleme metoduyla boyanması, basit ve ucuz olması nedeniyle son yıllarda sitogenetik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen önemli bir yöntemdir (Aydın, 2004). Gümüşleme metoduyla aktif olarak transkripsiyon yapan NOR bölgelerinin boyanması sırasında rRNA bölgeleri de boyanarak, ışık mikroskopunda küçük, koyu benekler halinde görünmektedirler. Gümüş boyama ile bu bölgelerdeki asidik proteinik yapılar (AgNOR) boyanmaktadır (Kuş ve ark., 2003; Aydın ve Çelik, 2005).

Bu çalışmada; yumurtacı ve etlik damızlık yumurtalarına kuluçkada aydınlatma uygulaması ile civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücrelerinde histolojik açıdan ve bu hücrelerin nukleus çap ve alanları ile AgNOR alanları bakımından herhangi bir farklılığın olup olmadığını belirleyerek, ileride yapılacak olan benzeri çalışmalara temel veriler sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Etik Onay

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 59/2013 Protokol numarası ile onaylanmıştır.

Hayvan Materyali

Çalışmada Hyline Brown genotipe sahip yumurtacı ve Ross 308 genotipe sahip etlik damızlıklardan elde edilen 576'şar adet toplam 1152 adet yumurtadan elde edilen civcivler kullanılmıştır.

Grupların Oluşturulması

Her genotipe sahip yumurtaların yarısı Victoria Combi Model I 12+H marka kuluçka makinesinde optimum kuluçka koşullarında ve karanlıkta inkübe edilirken (kontrol grubu); diğer yarısı ise yine optimum kuluçka koşullarında ancak bu defa günlük 16 saat aydınlatmanın uygulandığı (aydınlatma grubu) şartlarda inkübasyona bırakılmıştır.

Aydınlatma Uygulaması

Günlük 8 saat karanlık şartlarda inkübe edilen deneme grubundaki yumurtalar günün geri kalan 16 saatlik diliminde 150-200 Lux arasında değişen ışık şiddeti oluşturulan, 520 nm dalga boyunda (yeşil renk) ışık yayan LED ampullerin kullanıldığı aydınlatmaya maruz bırakılmıştır. Kuluçka işlemleri, her iki grupta

da standart koşullarda, giriş bölümünde (0-18 gün) 37.7°C sıcaklık ve %60 nem, çıkış bölümünde (18-21 gün) 37.5°C sıcaklık ve %65 nem altında yapılmıştır.

Hayvanların Seçimi

Bu çalışmada iki farklı genotip ve iki farklı aydınlatmanın uygulandığı etlik ve yumurtacı damızlıklara ait yumurtalardan çıkan civcivler ikisi kontrol ikisi deneme olmak üzere toplam dört gruba ayrılmıştır. Çalışmada en az sayıda hayvan kullanımı esası dikkate alınmıştır. Buna göre ticari yumurtacılar erkekler üretimde kullanılmadığı ve elde edilen veriler de pratiğe aktarılamadığından dişi civcivler kullanılırken; etlik genotiplerde ise erkekler dişilere göre daha hızlı gelişip daha yüksek canlı ağırlığa ulaştığı; buna karşın yüksek canlı ağırlıkları nedeniyle de metabolik problemler (asites, ani ölüm, bacak problemleri vb.) erkeklerde dişilere göre daha fazla görüldüğü için erkek civcivler tercih edilmiştir.

Beyincik Dokularının Temini

Kuluçka çıkışını takiben her gruptan rastgele seçilen 5'er civciv servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Beyinleri total olarak çıkartılan civcivlerin beyincik dokuları ayrılarak %10'luk formaldehit solüsyonuna aktarılmıştır.

Histolojik İşlemler

%10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat süreyle tespit edilen beyincik dokuları rutin doku takibi aşamalarından sonra parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki sagittal seri kesitlere, genel yapının belirlenebilmesi için Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması (Humason, 1962; Presnell ve Schreibman, 1997; Öber, 2009) yapılırken;

Nukleolus Düzenleyici Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions, NORs)'in belirlenmesi için ise AgNOR boyama metodu (Patkin ve Sorokin, 1983) uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 marka mikroskopta incelendikten sonra gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları histometrik analizler için ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak elektronik ortamda kaydedilmiştir.

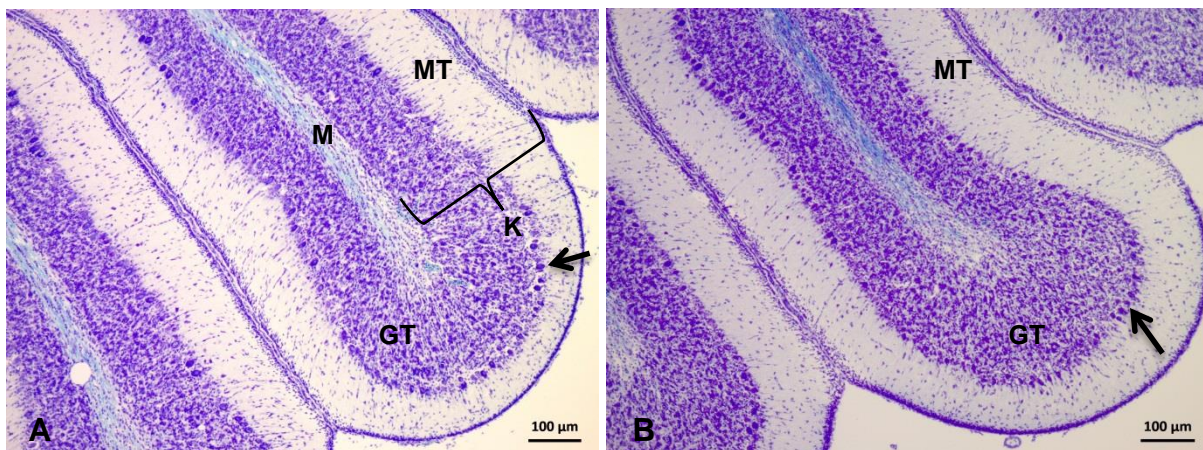
Histometrik Analizler

Her gruptan 15'er adet Purkinje hücrelerinin nükleus çapları, nükleus alanları ve NOR alanları Zeiss Axio Scope A1 marka mikroskopta ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak ölçülmüştür. İstatistiksel analizler PASW Statistics programında bağımsız T testi ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

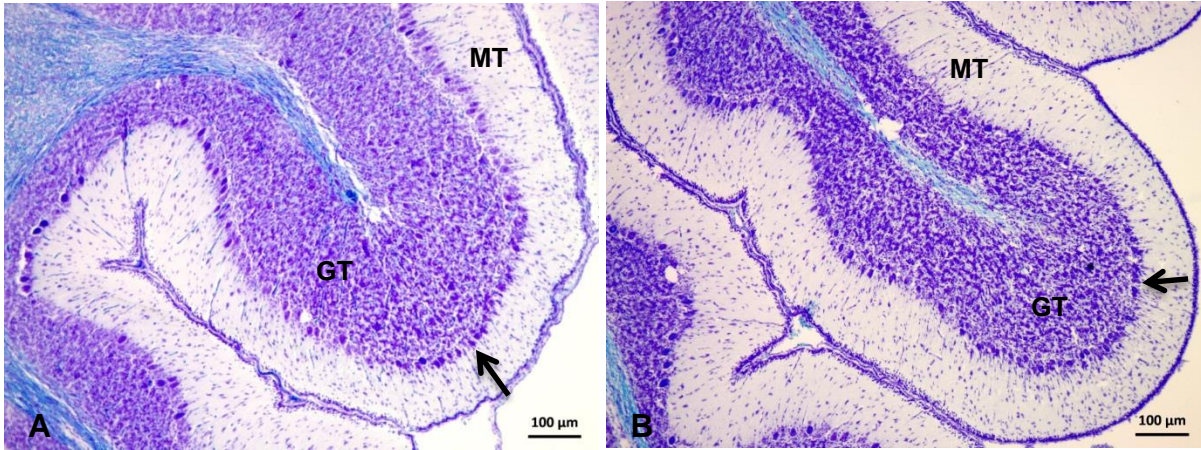
Luxol fast blue & Cresyl violet uygulanmış kesitler üzerinde yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerde beyincik dokusunun yaprak benzeri katlantılar olan ve derin oluklarla birbirinden ayrılan folyumlardan oluştuğu görülmüştür. Tüm gruplarda beyincik korteks ve medulla tabakalarının bilinen histolojik organizasyonda düzenlenmiş oldukları görülürken (Şekil 1 ve 2); beyincik korteksindeki moleküler tabaka ve granüler tabaka arasında tek sıra dizilimleri ile göze çarpan armut şekilli Purkinje hücreleri ise belirgin nükleus ve nukleoluslarının yanı sıra sitoplazmalarında yer alan Nissl tanecikleri ile dikkat çekmiştir (Şekil 3 ve 4).

Kontrol ve aydınlatma uygulanan gruplar arasında histolojik organizasyon bakımından herhangi bir fark belirlenmemiştir (Şekil 3 ve 4).



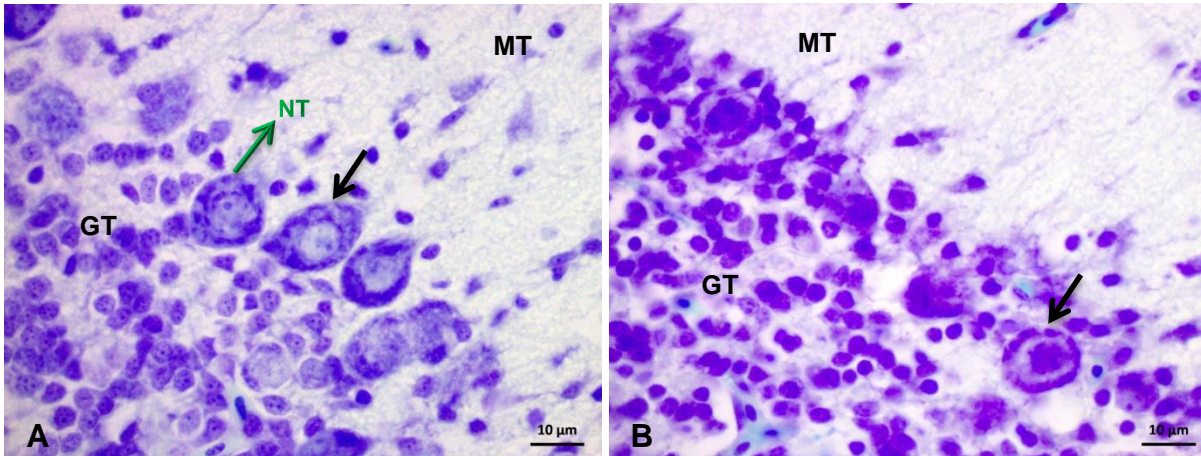
Şekil 1. Etlik civcivlerde beyincik folyumunun genel görünümü. A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, K: Korteks, M: Medulla, MT: Moleküler Tabaka, →: Purkinje hücreleri tabakası (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 1. General appearance of the cerebellar folium in broiler chicks. A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, K: Cortex, M: Medulla, MT: Molecular Layer, →: Layer of Purkinje cells (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).



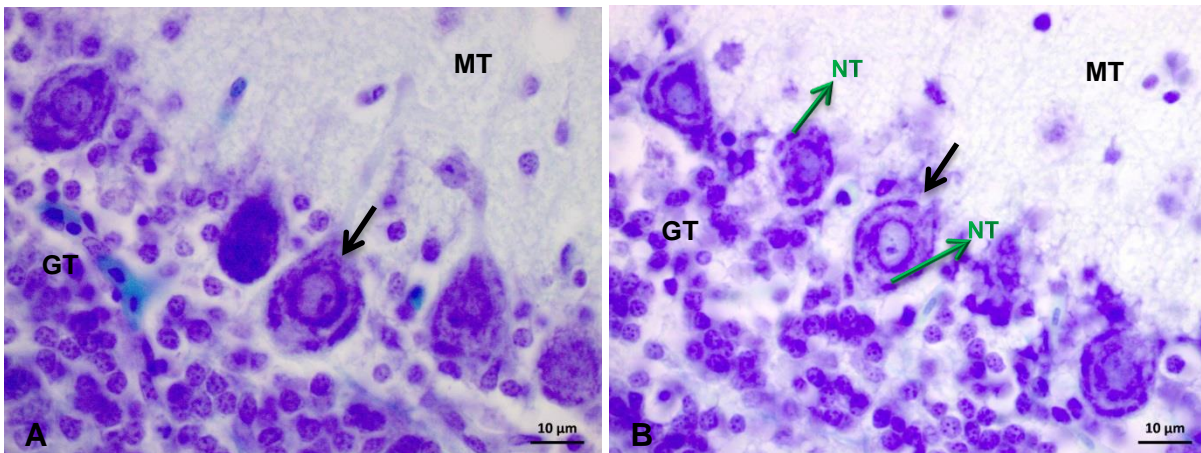
Şekil 2. Yumurtacı civcivlerde beyincik folyumunun genel görünümü. A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, →: Purkinje hücreleri tabakası (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 2. General appearance of the cerebellar folium in egg laying breed chicks. A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, →: Layer of Purkinje cells (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).



Şekil 3. Etlik civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücreleri (→). A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, NT: Nissl Tanecikleri (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 3. Purkinje cells in the cerebellum of broiler chicks (→). A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, NT: Nissl Bodies (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).

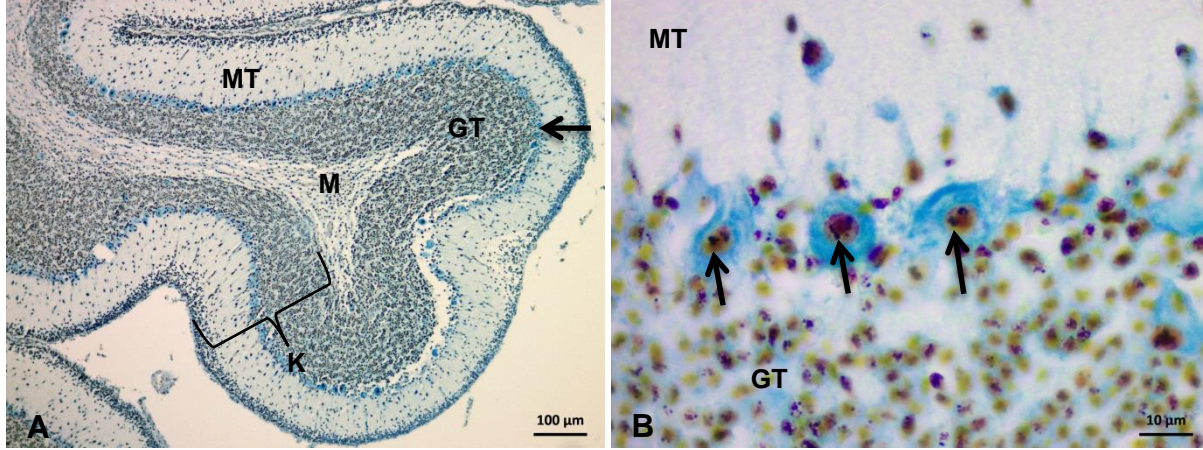


Şekil 4. Yumurtacı civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücreleri (→). A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, NT: Nissl Tanecikleri (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 4. Purkinje cells in the cerebellum of egg laying breed chicks (→). A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, NT: Nissl Bodies (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).

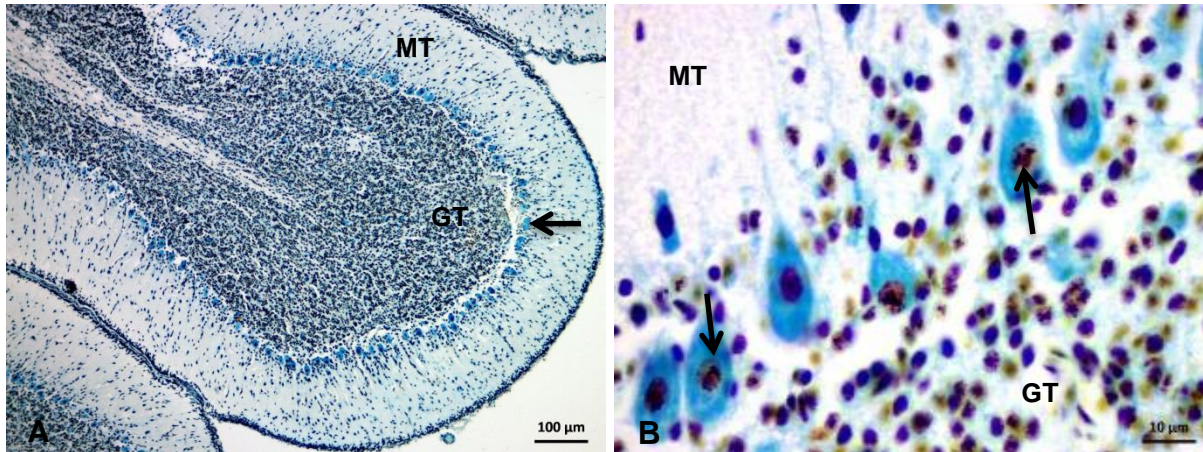
Patkin ve Sorokin (1983)'e göre uygulanan AgNOR boyası ile hazırlanan preparatlar üzerinde yapılan histometrik değerlendirmeler sonucunda kulučka döneminde aydınlatmaya maruz kalan etlik civcivlerde Purkinje hücrelerinin nukleus çapındaki sayısal artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilirken; Purkinje hücrelerinde nukleus alanı

ve NOR alanındaki artışın önemli olduğu görülmüştür (Şekil 5A-8A). Yumurtacı civcivlerde ise aydınlatma uygulanan grupta Purkinje hücrelerinin nukleus çaplarının, kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. Ancak, aydınlatmanın yumurtacı civcivlerde Purkinje hücrelerinin nukleus alanı ve NOR alanı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur (Şekil 5B-8B). (Tablo 1, $p < 0,05$).



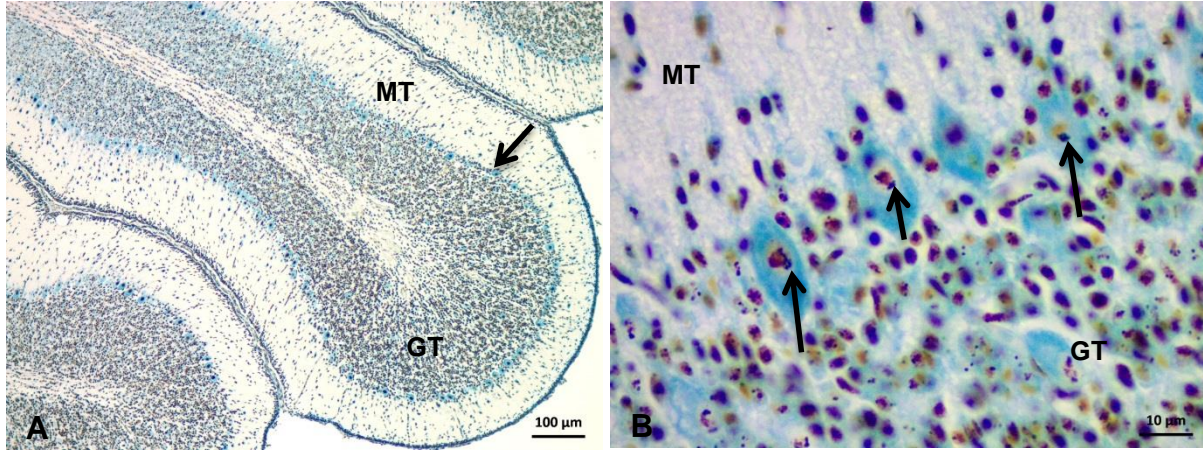
Şekil 5. Kontrol grubu etlik civcivlerde beyincik foliyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, K: Korteks, M: Medulla, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 5. The cerebellar folium of broilers chicks in control group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, K: Cortex, M: Medulla, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



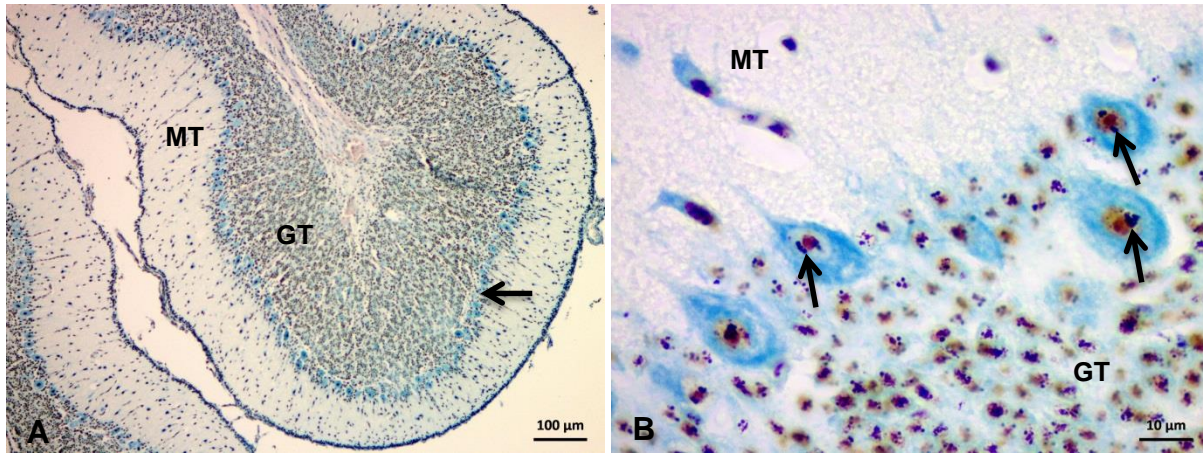
Şekil 6. Kontrol grubu yumurtacı civcivlerde beyincik foliyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 6. The cerebellar folium of egg laying breed chicks in control group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



Şekil 7. Aydınlatma uygulanan etlik civcivlerde beyincik foliyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 7. The cerebellar folium of broilers chicks in lighting group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



Şekil 8. Aydınlatma uygulanan yumurtacı civcivlerde beyincik foliyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 8. The cerebellar folium of egg laying breed chicks in lighting group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells, B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).

Tablo 1. Kontrol ve aydınlatma uygulanan civcivlere ait Purkinje hücrelerinin nukleus ve NOR parametreleri (±standart hata).

Table 1. Nucleus and NOR parameters of the Purkinje cells of chicks in the control and lighting treated groups (±standart error).

	Etlik civcivler		Yumurtacı civcivler	
	Kontrol grubu	Aydınlatma uygulanan grup	Kontrol grubu	Aydınlatma uygulanan grup
Purkinje hücresi nukleus çapı (µm)	5.637 ± 0.166	ÖD 5.773 ± 0.1660	5.184 ± 0.166	* 5.606 ± 0.166
Purkinje hücresi nukleus alanı (µm ²)	28.388±1.255	* 32.487±1.255	28.876±1.255	ÖD 29.862±1.255
NOR alanı (µm ²)	3.907±0.337	* 4.917±0.337	3.775±0.337	ÖD 3.931±0.337

* Aynı satırda etlik ya da yumurtacı civcivler için kontrol ve aydınlatma uygulanan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (P<0.05)

ÖD İstatistik olarak önemli değil (P>0.05)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir hücredeki kromozomların ribozomal RNA (rRNA) genlerini taşıyan bölgeleri, interfaz aşamasında nukleolusları oluşturmak üzere bir araya gelerek ışık mikroskopuyla nukleus içinde iri, yuvarlak ve belirgin cisimcikler halinde görünmektedirler. Kromozomların, nukleolusları oluşturan bu bölgeleri Nukleolus Düzenleyici Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions, NORs) olarak bilinmektedir. Bu bölgelerde bulunan ribozomal genlerle (rDNA) ilişkili olan nukleolar argirofilik (gümüş seven) ve histonik olmayan (asidik) proteinlere ise AgNOR proteinleri adı verilmektedir. Bir nukleustaki AgNOR'ların sayısı, hücre kinetiğini ve proliferatif aktiviteyi güvenilir bir şekilde yansıtmaktadır. NOR'lardaki argirofil proteinleri, rRNA transkripsiyonunda ve ribozomal biyogenezde önemli rol oynamaktadır. Bu proteinlerin miktarı, hücrenin ribozom sentezine göre aktivite durumunu göstermektedir (Ploton ve ark., 1986; Khanna ve Dutta, 2002; Aydın ve Çelik, 2005; Çelik ve ark., 2018).

İnterfaz sırasındaki bir nukleusun, NOR'larının gümüşleme metoduyla boyanması yöntemi, son yıllarda sitogenetik çalışmalarda kendine geniş yer bulan önemli, basit ve ucuz bir metottur. İnterfaz ya da mitoz sırasında transkripsiyonel olarak aktif olan AgNOR'ların yerleşimi, gümüş boyama metoduyla gösterilebilmektedir. Gümüş boyama tekniği; gümüş nitratın, asidik bir ortamda AgNOR proteinleri tarafından metalik gümüş indirgenmesine dayanmaktadır (Ploton ve ark., 1986; Aydın ve Çelik, 2005; Özparlak ve ark., 2015). AgNOR boyama metodu sayesinde hayvanlarda değişik verim özellikleri hakkında önemli ipuçları elde edilerek uzun süre beklemeden yüksek verimli hayvanların önceden tespit edilip seleksiyona tabi tutulabileceği öngörülmektedir (Akbulut ve ark., 2015).

Babcock-B-380 yumurtacı tavuklarla yürütülen bir çalışmada, kuluçkadan çıkış gününde alınan beyinciklerin Purkinje nukleus çapları ortalama $5.59 \pm 0.04 \mu\text{m}$, Purkinje nukleus alanları ortalama $32.44 \pm 0.81 \mu\text{m}^2$, AgNOR alanları ise ortalama $2.25 \pm 0.17 \mu\text{m}^2$ olarak ölçülmüştür. Ancak söz konusu çalışmada örnekler kuluçka sırasında herhangi bir ışık uygulamasına maruz bırakılmamıştır (Akar ve Sur, 2010).

Bir nukleustaki NOR alanının, nukleus alanıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Goodpasture ve ark., 1976; Mikelsaar ve ark., 1977; Alberts ve ark., 1989). Bir organizmanın farklı hücrelerinin veya farklı organizmaların benzer hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklar bulunmaktadır (Sur ve ark., 2003; 2011). Aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentezi ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Goodpasture ve ark., 1976;

Mikelsaar ve ark., 1977; Alberts ve ark., 1989). Bu görüş, sunulan bu çalışmada kuluçka döneminde aydınlatmaya maruz bırakılan etlik civcivlerin Purkinje hücrelerinin nukleus ve NOR alanlarındaki artma yönündeki eğilimiyle desteklenmektedir. Genel olarak, etlik civcivlerin, daha yüksek nukleus alanı ve NOR alanı değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Aktif olarak çoğalan ve transkripsiyon yapan hücrelerin NOR'larının daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ışığında NOR alanı değerinin fazla ölçülmesi, sentez aktivitesinin fazla olduğu bilinen tipik sinir hücrelerinden biri olan Purkinje hücrelerinde protein sentezinin fazla olduğunu, bunun da nukleuslarının daha büyük olmasına sebep olabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu durumun yumurtacı civcivler için söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgu yumurtacı ve etlik civcivlerin kuluçka döneminde uygulanan aydınlatmaya tepkilerinin farklı olabileceği bu farklılığın da etlik ve yumurtacı genotiplerin sahip oldukları farklı gelişim hızları ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çünkü, etlik genotipler başlıca hızlı gelişme ve yüksek canlı ağırlık, yumurtacı genotipler ise yüksek yumurta verimi yönünde geliştirilmektedir (Thiruvankadan ve Prabakaran, 2017). Ancak bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Akar S, Sur E 2010. The Development of Chicken Cerebellar Cortex and The Determination of Agnor Activity of The Purkinje Cell Nuclei. Belg J Zool 140(2): 214-22.
- Akbulut B, Sur E, Okur DN 2015. Determination of the AgNOR Parameters, MN Frequency, ANAE and ACP-ase Positivity of PBL in Pregnants. Selçuk Tıp Derg 31(4): 344-350.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1989. Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Newyork, 1146 pp.
- Archer G, Shivaprasad HL, Mench JA 2009. Effect of Providing Light During Incubation on The Health, Productivity and Behavior of Broiler Chickens. Poult Sci 88(1): 29-37.
- Aydın MF 2004. Yumurta ve Et Tavuklarının Farklı Dokularında Gümüşleme Metoduyla Boyanan Nukleolus Organizer Bölgelerin (AgNOR) Dağılımının Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji

- Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 104 sy.
- Aydın F, Çelik İ 2005. Yumurta ve Et Tavuklarının Karaciğerlerinde Gümüşleme Metoduyla Boyanan Nucleolus Organizer (AgNOR) Bölgeleri Dağılımının Belirlenmesi. *Vet Bil Derg* 21(1-2): 91-99.
- Bayram A, Özkan S 2010. Effects of 16L:8d Lighting Schedule on Behavioral Traits and Performance in Male Broiler Chickens. *J App Poult Res* 19: 263-273.
- Çelik İ, Şeker M, Salbacak A 2018. Histological and Histomorphometric Studies on The Cerebellar Cortex and Silver Stained Nucleolus Organizer Regions of Purkinje Neurons in Chronic Morphine-Treated Rats. *Veterinarski Arhiv* 88(1): 75-88.
- Dayıoğlu M, Özkan S 2013. The Effect of Lighted Incubation on Growth, Behavior, and Welfare of Broiler Chickens. 9th. European Symposium on Poultry Welfare, 17-20 June, 2013 Uppsala, Sweden. WPSA J Book of Abstracts, p:100.
- Espinar A, Piera V, Carmona A, Guerrero JM 1997. Histological Changes During Development of The Cerebellum in The Chick Embryo Exposed to A Static Magnetic Field. *Bioelectromagnetics* 18(1): 36-46.
- Goodpastuer C, Bloom SE, Hsu TC, Arrighi FE 1976. Human Nucleolus Organizers The Satellites or The Stalks. *Am J Hum Genet* 28: 559-566.
- Gündüz N, Öznurlu Y 2014. Adverse Effects of Aflatoxin B1 on Skeletal Muscle Development in Broiler Chickens. *British Poultry Science* 55(5): 684-692.
- Herrup K, Kuemerle B 1997. The Compartmentalization of The Cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 20: 61-90.
- Humason GL 1962. *Animal Tissue Techniques*. WH Freeman and Company, USA, 468 pp.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM 2013. *Principles of Neural Science*. 5th edition, The McGraw-Hill Companies, 1747 pp.
- Karol S, Suludere Z, Ayvalı C 2010. *Biyoloji Terimleri Sözlüğü*. Türk Dil Kurumu Yayınları, 5. baskı, Ankara, 1067 sy.
- Khanna A, Dutta J 2002. Effect of Enrofloxacin on AgNOR Counts in Chick Bone Marrow Nuclei. *Indian J Exp BioI* 40(3): 345-348.
- Kliger CA, Gehad AE, Hulet RM, Roush WB, Lillehoj HS, Mashaly MM 2000. Effects of Photoperiod and Melatonin on Lymphocyte Activities in Male Broiler Chickens. *Poult Sci* 79(1): 18-25.
- Koral-Taşçı S, Bingöl S 2018. Histological and Histometric Structure of Goose (*Anser anser*) Cerebellum. *Van Vet J* 29(2): 63-66.
- Kozanoğlu H 2010. Farklı Aydınlatma Programlarına Bağlı Olarak Değişen Endojen Melatonin Döngüsünün Etlik Piliçler Üzerindeki Etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 96 sy.
- Kristensen HH, Aets JM, Leroy T, Wathes CM, Berckmans D 2006. Modelling The Dynamic Activity of Broiler Chickens in Response to Step-Wise Changes in Light Intensity. *Appl Anim Behav Sci* 101: 125-143.
- Kuş İ, Öner J, Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M 2003. Sıçanlarda Melatonin Hormonunun Tiroid Folliküler Hücreleri Üzerine Etkisi: AgNOR Boyama ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *SÜ Tıp Fak Derg* 19: 1-8.
- Lewis P, Morris T 2006. *Poultry Lighting: The Theory and Practice*. Northcut Publishing, Wiltshire, 176pp.
- Luo J, Treubert-Zimmermann U, Redies C 2004. Cadherins Guide Migrating Purkinje Cells to Specific Parasagittal Domains During Cerebellar Development. *Mol Cell Neurosci* 25(1): 138-152.
- Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS 2004. Molecular Cytogenetic Definition of The Chicken Genome: The First Complete Avian Karyotype. *Genetics* 166: 1367-1373.
- Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, Schnedl W 1977. Frequency of Ag-Stained Nucleolus Organizer in The Acrocentric Chromosomes of Man. *Hum Genet* 37: 73-77.
- Öber A 2009. *Zoolojide Laboratuvar Teknikleri*. Ege Üniversitesi Basımevi, 3. Baskı. Bornova, İzmir, 210 sy.
- Öber A, Turgay-İzzetoğlu G 2020. *Histoloji*, Nobel Yayın No: 2255, 4. Baskı, Ankara, 326 sy.
- Özkan S, Yalçın S, Babacanoğlu E, Kozanoğlu H, Karadaş F, Uysal S 2012. Photoperiodic Lighting (16 h light: 8 h dark) Programs During Incubation: 1. Effects on Growth and Circadian Physiological Traits of Embryos and Early Stress Response of Broiler. *Poult Sci* 91: 2912-2921.
- Özparlak H, Akgül C, Çelik İ 2015. Effect of Nifedipine on Histology and AgNOR Parameters of Liver. *International Journal of Scientific and Technological Research* 1(8): 8-23.
- Patkin EL, Sorokin AV 1983. Nucleolus-Organizing Regions of Chromosomes in Early Embryogenesis of Laboratory Mice. *Bull Exp Biol Med* 96(2): 1142-1144.
- Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ 1986. Improvement in The Staining and in The Visualisation of The Argyrophilic Proteins of The Nucleolus Organizer Region at The Optical Level. *Histochem J* 18(1): 5-14.
- Prescott NB, Kristensen HH, Wathes CM 2004. *Light. (Measuring and Auditing Broiler Welfare)*, CABI Publishing, Cambridge, MA: Ed. Weeks CA, Butterworths A) 101-115.
- Presnell JK, Schreiberman MP 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. The Johns Hopkins University Press Ltd, London, 573 pp.
- Riedstra B, Groothuis TGG 2004. Prenatal Light

- Exposure Affects Early Feather-Pecking Behaviour in The Domestic Chick. *Animal Behaviour* 67: 1037-1042.
- Schwean-Lardner K, Vermette C, Leis M, Classen HL 2016. Basing Turkey Lighting Programs on Broiler Research: A Good Idea? A Comparison of 18 Daylength Effects on Broiler and Turkey Welfare. *Animals* 6(27): 1-16.
- Sur E, Çelik İ, Öznurlu Y, Aydın MF, Şen İ, Özparlak H 2003. Enzyme Histochemistry and AgNOR Numbers in the Peripheral Blood Leukocytes of 6-Month-old Kangal Bred Anatolian Shepherd Dogs. *Revue Méd Vét* 154(10): 591-598.
- Sur E, Öznurlu Y, Özaydın T, Çolakoğlu F, Ünsal S, Yener Y 2011. Comparative Histometrical Study of the Cerebellum and the Determination of Some AgNOR Parameters in Different Avian Species. *Bull Vet Inst Pulawy* 55: 261-265.
- Thiruvankadan A, Prabakaran R 2017. Recent Approaches in Poultry Breeding. *Appro Poult Dairy & Vet Sci* 2(2): APDV.000533.
- Trerè D 2000. AgNOR Staining and Quantification. *Micron* 31(2): 127-131.